



PAULA PERARO BARBOSA

**Caracterização Genética e Bioquímica da  
GES-16, uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do  
tipo GES com atividade carbapenemase em  
*Serratia marcescens*.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São  
Paulo/Escola Paulista de  
Medicina para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2011**

---

PAULA PERARO BARBOSA

**Caracterização Genética e Bioquímica da  
GES-16, uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do  
tipo GES com atividade carbapenemase em  
*Serratia marcescens*.**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Medicina da  
Universidade Federal de São  
Paulo/Escola Paulista de Medicina  
para obtenção do título de Mestre  
em Ciências pelo Programa de Pós-  
graduação em Ciências Básicas do  
Departamento de Doenças  
Infecciosas e Parasitárias.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Gales

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Renata Cristina Picão

**São Paulo**

**2011**

---

Barbosa, Paula Peraro

**Caracterização Genética e Bioquímica da GES-16, uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do tipo GES com atividade carbapenemase em *Serratia marcescens*.**/Paula Peraro Barbosa --São Paulo, 2011.

xxii. 161 fls.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Infectologia. Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Título em inglês:** Genetic and Biochemical Characterization of GES-16, a novel GES-type  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*.

1.  $\beta$ -lactamase. 2. Carbapenemase. 3. GES. 4. Resistência Bacteriana. 5. *Serratia marcescens*.

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**

**Disciplina de Infectologia**

Chefe do Departamento

**Prof. Dr. Reinaldo Salomão**

Chefe do Curso de Pós-Graduação

**Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz**

Chefe da Disciplina

**Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros**



---

PAULA PERARO BARBOSA

**Caracterização Genética e Bioquímica da  
GES-16, uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do  
tipo GES com atividade carbapenemase em  
*Serratia marcescens*.**

Presidente da banca

**Profª Drª Ana Cristina Gales**

Banca examinadora

Titular: **Drª. Karla Valéria Batista Lima**

Titular: **Dr. Nilton Ebert Lincopan Huenuman**

Titular: **Drª. Rosa Maria Silva**

Suplente: **Drª Érica Lourenço da Fonseca**

---

*Dedico este trabalho aos meus pais, João Carlos e Conceição, que sempre prezaram muito pela minha educação, não mediram esforços para que eu pudesse chegar onde estou hoje, e sempre acreditaram na minha vitória.*

---

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Gales, pela oportunidade de fazer parte do grupo LEMC/ALERTA. Obrigada pela dedicação, experiência, ensinamentos profissionais e pessoais, e sabedoria transmitidos ao longo destes anos. Saiba da minha grande admiração, consideração e respeito por você.

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Renata Cristina Picão, que muito me ensinou durante toda a realização deste trabalho. Tenho um enorme carinho e admiração por você!

Ao Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari, pela imensa dedicação ao grupo LEMC/ALERTA e pela disposição em nos auxiliar sempre que preciso.

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Karla Valéria Batista Lima, ao Dr. Nilton Ebert Lincopan Huenuman, à Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Silva e à Dr<sup>a</sup> Érica Lourenço da Fonseca por terem gentilmente aceitado participar da minha banca de defesa.

À minha família, e em especial meus pais João Carlos Barbosa e Conceição Aparecida Peraro, meus irmãos Renan Peraro Barbosa e Victor Peraro Barbosa, meus avós Clara Aparecida, João Peraro, Maria Gama e José Barbosa, e meus padrinhos Jonas Peraro e Márcia Cristina, pelo amor e apoio e incondicionais. Vocês são fundamentais em minha vida!

Ao Marcos Roberto Gonçalves pelo companheirismo, amizade e amor. Obrigada por ser tão presente em minha vida e por me ouvir sempre que precisei.

---

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório ALERTA, Bruna Nonato, Cecília Carvalhaes, Fernanda Petrolini, Juliana Provasi, Lygia Schandert, Rodrigo Cayô, e em especial Adriana Nicoletti, Danilo Elias, Eloiza Campana, Lorena Cristina e Raquel Girardello, pela amizade e imenso auxílio na conclusão deste trabalho. Vocês são muito queridos.

Aos amigos e colegas de trabalho do LEMC, em especial Karen Bauab e Talita Rochetti.

À secretária Rosana Capecce pela amizade e auxílio em diversos procedimentos burocráticos.

À Dr<sup>a</sup> Elizabeth de Andrade Marques por, gentilmente, ter cedido as amostras de *Serratia marcescens* do Hospital Universitário Pedro Ernesto para este estudo.

A todos do departamento de Biofísica, em especial ao Prof. Dr. Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira e ao Marcelo Ferreira Marcondes Machado, pelo estabelecimento desta importante colaboração. Obrigada por terem me recebido tão bem, por todos os ensinamentos e por todo o tempo dispensado comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa que possibilitou dedicação exclusiva para a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo principal.....	6
2.2 Objetivos secundários .....	6
<b>3. Revisão da literatura .....</b>	<b>7</b>
3.1. <i>Serratia marcescens</i> .....	8
3.2. Mecanismos de Resistência aos Carbapenems em <i>S. marcescens</i> ..	9
3.3. Carbapenemases em <i>S. marcescens</i> .....	12
3.3.1. Metallo- $\beta$ -lactamases.....	13
3.3.2. Serino-carbapenemases .....	16
3.3.2.1. $\beta$ -lactamases do tipo GES .....	18
3.4. Integrans .....	24
3.5. Caracterização de uma Nova $\beta$ -lactamase .....	32
3.5.1. Mecanismo de Hidrólise das Serino- $\beta$ -lactamases .....	33
3.5.2. Cinética Enzimática .....	35
3.5.3. Inibição Enzimática .....	39
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>42</b>
4.1. Amostras Bacterianas .....	43
4.2. Tipagem Molecular por Pulsed-Field Gel Electrophoresis.....	43
4.3. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	45
4.4. Detecção dos Mecanismos de Resistência aos Carbapenems.....	47
4.4.1. Teste de Hidrólise Enzimática do Imipenem .....	47
4.4.2. Detecção de Genes Codificadores de $\beta$ -lactamases .....	49
4.4.3. Sequenciamento e Interpretação dos Resultados .....	50
4.5. Estudo da Localização do Gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> por Híbridização .....	56

---

---

4.6. Análise da Transferência do Gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> .....	57
4.7. Clonagem de <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> .....	58
4.8. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os Transformantes EC190 e EC191, e para a Cepa EC-REC Carreando <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> Clonado .....	60
4.9. Determinação do Ponto Isoelétrico da $\beta$ -lactamase GES-16 .....	61
4.10. Clonagem de <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> em Vetor de Expressão .....	62
4.11. Expressão e Purificação da GES-16.....	64
4.12. Cinética .....	65
4.12.1. Determinação das Constantes de Michaelis-Menten .....	65
4.12.2. Determinação das Constantes de Inibição.....	67
<b>5. Resultados .....</b>	<b>69</b>
5.1. Amostras Bacterianas .....	70
5.2. Tipagem Molecular por Pulsed-Field Gel Electrophoresis.....	70
5.3. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	71
5.4. Detecção dos Mecanismos de Resistência aos Carbapenems.....	72
5.4.1. Teste de Hidrólise Enzimática do Imipenem .....	72
5.4.2. Detecção de Genes Codificadores de $\beta$ -lactamases .....	72
5.4.3. Sequenciamento e Interpretação dos Resultados .....	74
5.5. Estudo da Localização do Gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> por Hibridização .....	77
5.6. Análise da Transferência do Gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> .....	77
5.7. Clonagem do Gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> .....	78
5.8. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os Transformantes EC190 e EC191, e para a Cepa EC-REC Carreando <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> Clonado .....	78
5.9. Determinação do Ponto Isoelétrico da $\beta$ -lactamase GES-16 .....	79
5.10. Clonagem de <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> em Vetor de Expressão, Expressão em <i>E. coli</i> e Purificação da GES-16 .....	81
5.11. Cinética .....	81

---

---

5.11.1. Determinação das Constantes de Michaelis-Menten .....	81
5.11.2. Determinação das Constantes de Inibição.....	83
<b>6. Discussão .....</b>	<b>85</b>
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>109</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>112</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>129</b>
9.1. Anexo 1 – Sequência de Nucleotídeos do Integron Contendo <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> .....	130
9.2. Anexo 2 – Artigo Científico.....	133

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1. Os segmentos 5'CS e 3'CS estão representados com seus respectivos genes, e a região variável presente entre eles com dois cassetes gênicos. As setas largas indicam as ORFs, bem como o sentido da transcrição dos genes. O quadrado branco representa o sítio de recombinação da integrase *attI1*, enquanto os círculos representam os sítios de recombinação dos cassetes gênicos, *attC*. Os promotores  $P_c$ ,  $P_2$  e  $P_{int}$  estão indicados\_\_\_\_\_ **26**
- Figura 2.** Representação da estrutura do sítio de recombinação *attI1*. Os domínios L e R do sítio simples estão destacados em cinza e identificados por setas horizontais preenchidas que indicam a direção da repetição entre as sequências. A seta vertical indica o ponto em que ocorre a recombinação sítio-específica. Os domínios DR1 e DR2 estão indicados por setas horizontais sem preenchimento e são formados por sequências de repetição diretas, demonstrado pelo sentido das setas\_\_\_\_\_ **27**
- Figura 3.** Representação das estruturas primárias e secundárias do sítio de recombinação *attC*. (A) Estrutura primária do *attC*. Os domínios de ligação da integrase 1L, 2L, 1R e 2R estão destacados em cinza, formando os sítios simples LH e RH. Setas horizontais indicam a direção das sequências de repetição invertidas imperfeitas que formam estes domínios. A base G protuberante presente no domínio 2L em relação à 2R está indicada por um asterisco. A seta vertical indica o ponto em que ocorre a recombinação sítio-específica. (B) Estrutura secundária em forma de grampo formada pelo



---

pareamento 1R-1L e 2R-2L quando o *attC* se encontra em fita simples \_\_\_\_\_ 29

**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo de inserção dos cassetes gênicos na região variável do integron. (A) Estrutura do cassete em sua forma linear, quando está inserido no integron. A região codificante está representada por um retângulo azul, e os domínios 1L, 2L, 1R e 2R do *attC* estão representados por retângulos brancos. Nesta forma linear, o domínio 1R de 7pb (sítio *core*), GTTRRRY, onde ocorre a recombinação, encontra-se dividido, sendo que apenas a primeira base (G) encontra-se à 3' do cassete, e o restante da sequência (TTRRRY) encontra-se à 5' do cassete. (B) A recombinação entre os sítios *attI1* e *attC* leva à linearização do cassete e formação de sítios *core* compostos. Neste esquema está representada a configuração dos sítios *core* após inserção do cassete\_ 30

**Figura 5.** Representação esquemática da reação de hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos pelas serino- $\beta$ -lactamases. Neste esquema, E é a enzima  $\beta$ -lactamase, S é o substrato  $\beta$ -lactâmico, E:S é o complexo pré-acilação, E-S é o complexo acil-enzima, e P é o produto ( $\beta$ -lactâmico inativado). As constantes para cada passo desta reação estão representadas por  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  e  $k_3$ , onde  $k_1$  e  $k_{-1}$  são as constantes de associação e dissociação do complexo pré-acilação, respectivamente;  $k_2$  é a constante de acilação; e  $k_3$  é a constante de deacilação 34

**Figura 6.** Mecanismo de inativação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelas serino- $\beta$ -lactamases. (a) Agente  $\beta$ -lactâmico. (b) Composto intermediário de alta energia formado após o ataque nucleofílico da serina 70 na carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico. (c) Complexo acil-enzima, formado após protonação do nitrogênio do anel  $\beta$ -lactâmico e quebra

---

da ligação C-N. (d) Deacilação por ataque de uma molécula de água com liberação do  $\beta$ -lactâmico inativo e da molécula de enzima intacta\_\_\_\_\_ 35

**Figura 7.** Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente. Por este tipo de gráfico a  $V_{máx}$  pode ser determinada apenas aproximadamente, isto porque  $V_0$  se aproximará progressivamente de  $V_{máx}$ , mas nunca chegará a atingi-la. A concentração de substrato na qual  $V_0$  é a metade de  $V_{máx}$  é o  $K_m$ , a constante de Michaelis-Menten\_\_\_\_\_ 37

**Figura 8.** Avaliação da similaridade genética entre os isolados SM190 e SM191 pela técnica de PFGE, cujos DNAs genômicos foram digeridos com *SpeI* e separados por eletroforese em campo pulsátil com variação de corrente elétrica de 5 a 60 segundos, por 23h a 200V. Coluna 1, padrão de peso molecular  $\lambda$  (Kb); Coluna 2, *S. marcescens* SM190; Coluna 3, *S. marcescens* SM191; Coluna 4, padrão de peso molecular  $\lambda$  (Kb)\_\_\_\_\_ 71

**Figura 9.** (A) Representação esquemática do integron carreador do gene *bla*<sub>GES-16</sub>. As setas cinzas representam as regiões codificantes e indicam o sentido da transcrição, e os *attC*s estão indicados por retângulos brancos. (B) Comparação entre a sequência de nucleotídeos do integron identificado neste estudo (número de acesso no GenBank HM173356) e um integron similar previamente identificado em *Pseudomonas aeruginosa* (número de acesso no GenBank DQ393783), demonstrando as estruturas perdidas no primeiro. As sequências -35 e -10 dos promotores  $P_c$ ,  $P_2$  e  $P_{int}$  estão identificadas. Os códons de iniciação dos genes *int1* e *catB3* estão indicados por setas horizontais nas duas sequências nucleotídicas, enquanto o sítio de recombinação *att1* (domínios DR1, DR2, L e R),

faltante no integron carreador de *bla*<sub>GES-16</sub>, está indicado na sequência de *P. aeruginosa*. A provável região onde ocorreu recombinação homóloga está destacada e indicada por asterisco na sequência de *S. marcescens*\_ 76

**Figura 10.** (A) Eletroforese das extrações de DNA total e DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191. (B) Hibridização da sonda marcada específica para o gene *bla*<sub>GES-16</sub> com a extrações de DNA total e DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191. Coluna 1, sonda marcada específica para *bla*<sub>GES-16</sub>; Coluna 2, DNA total da amostra SM190; Coluna 3, DNA total da amostra SM191; Coluna 4, DNA plasmidial da amostra SM190; Coluna 5, DNA plasmidial da amostra SM191; Coluna 6, DNA plasmidial da amostra 50192, utilizada como marcador de peso molecular (7 Kb, 38 Kb, 66 Kb, 154 Kb)\_\_\_\_\_ 77

**Figura 11.** Eletroforese das extrações de DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191 e de seus respectivos transformantes. Coluna 1, DNA plasmidial da amostra SM190; Coluna 2, DNA plasmidial do transformante EC190; Coluna 3, DNA plasmidial da amostra SM191; Coluna 4, DNA plasmidial do transformante EC191; Coluna 6, DNA plasmidial da amostra 50192, utilizada como marcador de peso molecular\_\_\_\_\_ 78

**Figura 12.** Focalização do ponto isoelétrico dos extratos protéicos dos isolados clínicos SM190 e SM191, de seus transformantes EC190 e EC191, da cepa EC-REC contendo *bla*<sub>GES-16</sub> clonado, e das amostras-controles TEM-1 (pI = 5,4), FOX-5 (pI = 7,2) e SHV-18 (pI = 7,8)\_\_\_\_\_ 81

**Figura Anexo 1.** Sequência de nucleotídeos do integron contendo *bla*<sub>GES-16</sub>. Os cassetes gênicos estão identificados por setas, indicando o sentido da transcrição. Os domínios 1L, 2L, 1R e 2R dos *attC*s e o promotor P<sub>c</sub> estão identificados\_\_\_ 132

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	$\beta$ -lactamases identificadas em <i>Serratia marcescens</i> , de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular_____	<b>13</b>
<b>Tabela 2.</b>	Primeiras descrições de $\beta$ -lactamases do tipo GES. Variante descrita, classificação da enzima quanto perfil hidrolítico, localização do gene <i>bla</i> <sub>GES</sub> , microorganismo no qual o gene foi encontrado, ano de isolamento e referência do estudo____	<b>23</b>
<b>Tabela 3.</b>	Cepas controle utilizadas neste estudo para a detecção de genes de resistência, por meio da técnica de PCR_____	<b>51</b>
<b>Tabela 4.</b>	Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes codificadores de $\beta$ -lactamases_____	<b>52</b>
<b>Tabela 5.</b>	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados clínicos de <i>S. marcescens</i> SM190 e SM191, seus transformantes EC190 e EC191, a cepa EC-REC contendo o gene <i>bla</i> <sub>GES-16</sub> clonado e a cepa receptora <i>E. coli</i> TOP10, realizado pela técnica de microdiluição em caldo, segundo as recomendações do CLSI (2010)_____	<b>73</b>
<b>Tabela 6.</b>	Perfil hidrolítico da $\beta$ -lactamase GES-16_____	<b>83</b>
<b>Tabela 7.</b>	Perfil de inibição da $\beta$ -lactamase GES-16_____	<b>84</b>

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABC** – ATP Binding Cassette

**AC** – Ácido clavulânico

**ATCC** – American Type Culture Collection

**CHDL** – Carbapenem-hidrolizing class D  $\beta$ -lactamases

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CLSI** – Clinical Laboratory Standards Institute

**CS** – Sequência conservada

**EDTA** – Ácido etileno-diamino-tetracético

**ESAC** – AmpC de espectro estendido

**ESBL** –  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

**EUA** – Estados Unidos da América

**HUPE** – Hospital Universitário Pedro Ernesto

**IMU** – Integron mobilization unit

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo

**IRAS** – Infecção relacionada à assistência à saúde

**LB** – Luria-Bertani

**LEMC** – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

**LH** – Left-Hand

**MBL** – Metallo- $\beta$ -lactamases

**MFS** – Major Facilitator Superfamily

**MH** – Mueller-Hinton

---

**MYSTIC** – Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection

**NCTC** – National Collection of Type Cultures

**OMP** – Outer membrane protein ou proteína de membrana externa

**ORF** – Open Reading Frame

**pAmpC** – AmpC plasmidial

**pb** – pares de bases

**PBP** – Proteínas ligadoras de penicilinas

**PCR** – Reação da cadeia da polimerase

**PFGE** – Pulsed Field Gel Electrophoresis

**pI** – Ponto isoelétrico

**QRDR** – Quinolone resistance determining region

**RH** – Right -Hand

**RND** – Resistance-Nodulation Division

**SD** – Shine-Delgarno

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**SMR** – Small Multidrug Resistance

**TIR** – Região iniciadora de tradução

**TSB** – Caldo triptico de soja

**UFC** – Unidades formadoras de colônia

**UNIFESP/EPM** – Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina

**UTI** – Unidade de Terapia Intensiva

**UV** – Ultravioleta

---

## RESUMO

Duas amostras clínicas de *S. marcescens* resistentes aos carbapenens foram isoladas em 2005 de dois pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro). A tipagem molecular por PFGE revelou que os isolados eram genotipicamente idênticos. O teste de sensibilidade por microdiluição em caldo confirmou a resistência dos isolados de *S. marcescens* aos carbapenens. Adicionalmente, estes isolados apresentaram resistência à ticarcilina, à ceftazidima, à gentamicina, ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina; porém, apresentaram sensibilidade à cefepima e ao aztreonam. Ambos apresentaram teste de hidrólise do imipenem positivo, e os amplicons *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>OXA-10</sub> foram identificados por PCR e sequenciamento. Uma nova variante GES, apresentando as substituições Gly170Ser, responsável pela atividade carbapenemase, e Gln43Glu em relação à GES-1, foi identificada e nomeada GES-16. *Bla*<sub>GES-16</sub> estava inserido em um integron de classe 1 que possui um promotor fraco, um gene codificador da integrase truncado, e uma região variável composta pelos seguintes cassetes gênicos: *catB3* truncado, *bla*<sub>GES-16</sub>, *dfr22*, *aac(6')-IIc* e *aadA1*. Ensaios de hibridização sugeriram a localização plasmidial de *bla*<sub>GES-16</sub>, posteriormente confirmada pela obtenção de transformantes. No entanto, o plasmídeo de cerca de 30 Kb contendo *bla*<sub>GES-16</sub> não apresentou capacidade conjugativa. A expressão de *bla*<sub>GES-16</sub> clonado em *E. coli* TOP10, bem como a transferência do plasmídeo carreador de *bla*<sub>GES-16</sub> para esta cepa, confirmaram a elevação das CIMs dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenens. GES-16 apresentou pl igual a 5,6. Ensaios de cinética enzimática utilizando GES-16 purificada demonstraram sua atividade sobre as penicilinas,

---

as cefamicinas, as cefalosporinas de amplo espectro e os carbapenems, mas não sobre o aztreonam. Ainda, demonstraram que GES-16 é inibida pelo ácido clavulânico, pelo tazobactam, e em menor grau pelo imipenem. O presente estudo identificou uma nova variante de GES com atividade carbapenemase em Enterobacteriaceae no Brasil.



---

## ABSTRACT

During 2005, two *Serratia marcescens* isolates showing carbapenem resistance were recovered from patients hospitalized at Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro). Molecular typing by PFGE revealed that the isolates were genetically identical. Susceptibility testing performed by CLSI broth microdilution confirmed the carbapenem resistance in *S. marcescens* clinical isolates. In addition, these isolates were fully resistant to ticarcilin, ceftazidime, gentamicin, nalidixic acid and ciprofloxacin, but showed susceptibility to cefepime and aztreonam. Both isolates showed carbapenemase activity and *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>OXA-10</sub> were subsequent identified by PCR and sequencing. A new GES variant, differing from GES-1 by the Gly170Ser, responsible for its carbapenemase activity, and Gln43Glu substitutions, was identified and named GES-16. *Bla*<sub>GES-16</sub> was part of a defective class 1 integron containing a weak promoter, a fragmented integrase gene, and a variable region comprising the following gene cassettes: a fragmented *catB3*, *bla*<sub>GES-16</sub>, *dfr22*, *aac(6')-IIc* and *aadA1*. Hybridization assays suggested the plasmid location of *bla*<sub>GES-16</sub>, later confirmed by transformants obtaining. However, the 30 Kb plasmid harboring *bla*<sub>GES-16</sub> did not seem to be conjugative. Expression of cloned *bla*<sub>GES-16</sub> and the transference of the natural plasmid carrying *bla*<sub>GES-16</sub> to *E. coli* TOP10 resulted in increased  $\beta$ -lactams MICs, including carbapenems, in comparison to those of the wild recipient strain. GES-16 showed pl of 5,6. Kinetic analysis conducted with purified GES-16 showed hydrolytic activity against penicillins, cephamycins, expanded-spectrum cephalosporins, and carbapenems, but not aztreonam. Moreover, it showed that GES-16 is inhibited by clavulanic acid,

---

tazobactam and, in less extent, by imipenem. This study identified a new GES-type enzyme with carbapenemase activity in Enterobacteriaceae in Brazil.

# *1. INTRODUÇÃO*

*Serratia marcescens* é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos. Trata-se de um importante patógeno causador de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e oportunistas, especialmente infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário, sepse, pneumonia e infecções de feridas. *S. marcescens* está também frequentemente associado à contaminação de equipamentos médicos e soluções com baixo poder desinfetante (de Vries *et al.*, 2006; Maragakis *et al.*, 2008).

A vasta disseminação de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) entre os membros da família Enterobacteriaceae tem comprometido o uso de cefalosporinas de amplo espectro para o tratamento de infecções causadas por estes patógenos em pacientes hospitalizados. Como consequência, o uso terapêutico dos carbapenens tem aumentado significativamente. Devido à forte pressão seletiva exercida por seu uso excessivo, um crescente aumento na resistência a estas drogas tem sido observado por todo o mundo durante a última década (Castanheira *et al.*, 2008; Hawkey *et al.*, 2009).

A resistência aos carbapenens pode ocorrer devido à combinação e modulação de diferentes mecanismos, sejam eles intrínsecos da bactéria ou adquiridos, como, modificações na permeabilidade da membrana externa associada à hiperprodução de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC ou ESBL. Entretanto, atualmente, a produção de  $\beta$ -lactamases que degradam os carbapenens, conhecidas como carbapenemases, representa o principal mecanismo de resistência a estas drogas em enterobactérias (Deshpande *et al.*, 2006a; Nordmann *et al.*, 2009).

---

Os genes codificadores de carbapenemases estão frequentemente associados a elementos genéticos móveis, tais como transposons e integrons, e, portanto, possuem grande potencial de disseminação. De fato, recentemente tem sido observado um aumento significativo no surgimento e na disseminação destes determinantes de resistência (Queenan & Bush, 2007). A disseminação de genes codificadores de carbapenemases entre enterobactérias causadoras de IRAS frequentemente restringem as opções terapêuticas à tigeciclina e às polimixinas (Livermore, 2002). Em microorganismos intrinsecamente resistentes às polimixinas, como *S. marcescens*, a disseminação destes determinantes de resistência é particularmente preocupante, pois dificulta ainda mais o tratamento de infecções causadas por estes microorganismos e impõe um sério desafio aos profissionais de saúde.

As carbapenemases são classificadas de acordo com os seus requerimentos funcionais e a estrutura de seu sítio ativo, podendo ser divididas em serino- $\beta$ -lactamases, pertencentes às classes A e D de Ambler, e em metalo- $\beta$ -lactamases, pertencentes à classe B de Ambler. As serino-carbapenemases da classe A de Ambler incluem KPC, GES, SME, IMI e NMC-A, enquanto aquelas pertencentes à classe D de Ambler incluem as oxacilinases, também denominadas CHDLs (“carbapenem-hidrolising class D  $\beta$ -lactamases”) (Ambler, 1980; Poirel *et al.*, 2007a; Castanheira *et al.*, 2008; Nordmann *et al.*, 2009).

As  $\beta$ -lactamases do tipo GES foram primeiramente descritas em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* proveniente da Guiana Francesa, em 2000. GES-1, a primeira variante desta família a ser descrita, apresentava propriedades bioquímicas de uma ESBL e não possuía atividade hidrolítica

---

frente aos carbapenems (Poirel *et al.*, 2000). Entretanto, foi demonstrado que a substituição de uma glicina por asparagina ou serina na posição 170 de Ambler, localizada no interior da região  $\Omega$ -loop das  $\beta$ -lactamases de classe A de Ambler, seria capaz de ampliar o espectro de hidrólise das  $\beta$ -lactamases do tipo GES aos carbapenems (Queenan & Bush 2007). Desde a descrição de GES-1, quinze novas variantes de  $\beta$ -lactamases do tipo GES já foram descritas, e dentre elas GES-2, -4, -5, -6, -11, -12, -14 e -15 possuem atividade carbapenemase (Naas *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2000; <http://lahey.org/studies/other.asp>).

Neste trabalho, foi realizada a identificação e a caracterização genética e bioquímica de uma nova variante de GES com atividade carbapenemase, nomeada GES-16.

---

## *2. OBJETIVOS*

---

## 2.1 Objetivo principal

- Realizar a caracterização genética e bioquímica de uma nova variante de  $\beta$ -lactamase, GES-16, identificada em isolados clínicos de *S. marcescens* resistentes aos carbapenems.

## 2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a similaridade genética entre os dois isolados de *S. marcescens* resistentes aos carbapenems estudados;
  - Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para os dois isolados clínicos de *S. marcescens*;
  - Identificar os genes codificadores de  $\beta$ -lactamase presentes nos isolados de *S. marcescens* resistentes aos carbapenems estudados;
  - Determinar a sequência de nucleotídeos e o contexto genético do gene codificador da nova variante de  $\beta$ -lactamase identificada e nomeada GES-16;
  - Determinar a localização, cromossomal ou plasmidial, do gene codificador da  $\beta$ -lactamase GES-16;
  - Avaliar a capacidade de transferência do gene *bla*<sub>GES-16</sub> para cepas de *Escherichia coli* de linhagens laboratoriais pelas metodologias de transformação e conjugação;
  - Avaliar a contribuição relativa da presença do gene *bla*<sub>GES-16</sub> no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;
  - Determinar o ponto isoelétrico da  $\beta$ -lactamase GES-16;
  - Determinar o perfil cinético e o perfil de inibição da  $\beta$ -lactamase GES-16.
-



### *3. REVISÃO DA LITERATURA*

---

### 3.1 *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* são bacilos Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. As espécies de *Serratia* são anaeróbias facultativas, móveis, fermentadoras de glicose, oxidase negativas, indol negativas, reduzem nitrato a nitrito, e são produtoras de pouco ou nenhum gás a partir da fermentação da glicose. Alguns membros deste gênero produzem pigmento vermelho característico e podem ser distinguidos de outros gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae pela produção de três enzimas: DNase, lipase e gelatinase. A ausência da fermentação da arabinose e melibiose distingue a *S. marcescens* das outras espécies de *Serratia* (Farmer et al., 2007).

O gênero *Serratia* inclui 15 espécies e 4 subespécies: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens* (subespécies *marcescens* e *sakuensis*), *S. marinorubra*, *S. nematodiphila*, *S. odorífera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* (subespécies *proteamaculans* e *quinovora*), *S. quinivorans*, *S. rubidaeeae*, *S. ureilytica* (Euzéby, 2011). Entretanto, *S. marcescens* é a espécie mais conhecida e estudada, por ser mais frequentemente isolada em espécimes clínicos.

*Serratia marcescens* é um patógeno causador de IRAS e infecções oportunistas, especialmente infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário, sepse, infecções de feridas e pneumonia, entre outras. Este microorganismo tem sido responsável por surtos em unidades de terapia intensiva (UTI) e em neonatos, eventos frequentemente associados à contaminação de aparelhos e soluções, como dutos condutores de ar, sabonetes e desinfetantes (Maragakis et al., 2008). *S. marcescens* pode

---

sobreviver na pele por grandes períodos, e por isso a contaminação através das mãos dos profissionais de saúde constitui uma importante fonte de infecção (de Vries *et al.*, 2006; Maragakis *et al.*, 2008; Sartor *et al.*, 2000, Uduman *et al.*, 2002). É intrinsecamente resistente à vários antimicrobianos, como, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração, cefoxitina e polimixinas, o que dificulta o tratamento de infecções causadas por este patógeno (Livermore *et al.*, 2001).

No Brasil, os relatos de infecções causadas por *S. marcescens* estão geralmente associados à ocorrência de surtos em unidades de terapia intensiva, especialmente em neonatos, embora existam também relatos da ocorrência de infecções comunitárias por *S. marcescens* (Lima *et al.*, 2011; Minarini *et al.*, 2007; Von Dolinger Brito *et al.*, 1999).

### **3.2 Mecanismos de Resistência aos Carbapenens em *S. marcescens***

Em enterobactérias, a resistência aos carbapenens pode ocorrer devido à associação e/ou modulação de diferentes mecanismos, tais como hiperexpressão de sistemas de efluxo; associação de perda de porinas com a hiperexpressão de sistemas de efluxo; associação de perda de porinas com a hiperexpressão de  $\beta$ -lactamases constitutivas ou com a produção de  $\beta$ -lactamases adquiridas, como AmpC e CTX-M, respectivamente; alteração do sítio alvo da droga, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs - *penicillin binding protein*); e a produção de  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar os carbapenens, enzimas conhecidas como carbapenemases (Walther-Rasmussen & Hoiby, 2007).

---

Até o momento foram descritos em *S. marcescens* seis sistemas de efluxo, sendo três da família RND (*resistance-nodulation division*, SdeAB, SdeCDE e SdeXY), um da família ABC (*ATP binding cassette*, SmdAB), um da família MFS (*major facilitator superfamily*, SmfY), e um da família SMR (*small multidrug resistance*, SsmE) (Begic & Worobec, 2008; Chen *et al.*, 2003; Kumar & Worobec, 2005; Matsuo *et al.*, 2008; Minato *et al.*, 2008; Shahcheraghi *et al.*, 2007). Tais sistemas possuem especificidades diferentes para substratos variados, como, ciprofloxacina, norfloxacin, cloranfenicol, novobiocina, eritromicina, tetraciclina, ampicilina, biocidas, entre outros. Embora muitos autores tenham observado a contribuição de sistemas de efluxo para a resistência aos carbapenems em diferentes patógenos, até o momento não foi descrita a resistência aos carbapenems associada à hiperexpressão destas bombas de efluxo em isolados clínicos de *S. marcescens*.

Alterações na expressão de proteínas de membrana externa (OMP), também conhecidas como porinas, levando à resistência a diversos antibióticos, como agentes  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas, já foram descritas em *S. marcescens*. Nesta espécie, foram identificadas duas porinas principais, denominadas OmpC (40 kDa) e OmpF (41 kDa) por sua similaridade com as porinas de mesmo nome descritas e bem caracterizadas em *Escherichia coli*. O envolvimento da alteração na expressão de porinas com a resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenems em isolados clínicos de *S. marcescens* já foi descrita em alguns trabalhos, e em muitos deles é resultante da associação de alteração na permeabilidade à produção de  $\beta$ -lactamases, como  $\beta$ -lactamases de espectro estendido e metalo- $\beta$ -lactamases ou

---

hiperexpressão da cefalosporinase cromossomal AmpC (Marumo *et al.*, 1996; Pagès *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2010; Weindorf *et al.*, 1998).

As proteínas ligadoras de penicilina são os sítios-alvo para a atividade dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos devido à alterações nas PBPs é mais comum em microorganismos Gram-positivos do que em Gram-negativos. Embora alguns trabalhos já tenham identificado 8 PBPs em *S. marcescens*, não existem estudos mostrando a associação entre alteração de PBP e resistência aos  $\beta$ -lactâmicos nesta espécie até o momento (Gunkel *et al.*, 1991; Gutmann & Chabbert, 1984; Poole, 2004).

Embora mecanismos de impermeabilidade associados à produção de  $\beta$ -lactamases incapazes de hidrolisar os carbapenens tenham sido associados à resistência aos carbapenens em *S. marcescens*, o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento de altos níveis de resistência a estas drogas é a sua destruição enzimática por meio da produção de carbapenemases (Bush, 2001). Nestes organismos, estas enzimas se concentram no espaço periplásmico, inativando os antimicrobianos antes que eles atinjam seus alvos, as PBPs, que se situam na membrana citoplasmática (Livermore & Woodford, 2006).

Os carbapenens podem ser hidrolisados por vários tipos de carbapenemases. A grande maioria dessas enzimas opera via produção de ésteres de serina, razão pela qual são denominadas serino-carbapenemases. Outras, denominadas metalo- $\beta$ -lactamases, utilizam íons de zinco como cofatores enzimáticos em seu sítio ativo (Livermore, 1995).

As serino-carbapenemases atuam por meio da quebra da ligação amida no anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico. A enzima associa-se de forma não covalente

---

ao anel  $\beta$ -lactâmico e, então, o radical hidroxila livre do resíduo da serina ataca o anel  $\beta$ -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima, que ainda possui atividade hidrolítica, e o antimicrobiano hidrolisado e inativo (Livermore, 1995).

O mecanismo hidrolítico das metalo- $\beta$ -lactamases não é totalmente conhecido. Entretanto, é sabido que o zinco presente no sítio ativo da enzima se associa a uma molécula de água e interage com o oxigênio do grupamento carboxila do anel  $\beta$ -lactâmico. Tal interação polariza este grupamento carboxila, deixando o respectivo átomo de carbono suscetível ao ataque nucleofílico realizado pelo radical hidroxila da molécula de água (Crowder *et al.*, 2006; Tamilselvi & Mugesh, 2008).

### 3.3 Carbapenemases em *Serratia marcescens*

Os dados sobre identificação de  $\beta$ -lactamases em *S. marcescens* são escassos visto que muitos estudos fornecem os resultados da espécie agrupados aos dados da família Enterobacteriaceae. Além disso, muitos estudos tratam-se de levantamentos epidemiológicos e apenas fornecem a detecção do tipo de  $\beta$ -lactamase encontrada, sem chegar à identificação final da variante produzida. As  $\beta$ -lactamases já identificadas em isolados clínicos de *S. marcescens* estão resumidas na Tabela 1. Abaixo serão descritas as enzimas do tipo carbapenemases que já foram identificadas nesta espécie, organizadas segundo suas respectivas classificações por grupo funcional e classe molecular.

---

**Tabela 1.**  $\beta$ -lactamases identificadas em *Serratia marcescens*, de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular.

Grupo funcional de Bush-Jacoby	Classe molecular de Ambler	Enzimas	Referências
1	C	AmpC <sup>a</sup> pAmpC: DHA-1	Hidri <i>et al.</i> , 2005; Jacoby, 2009; Mammeri <i>et al.</i> , 2004; Matsumura <i>et al.</i> , 1998; Yatsuyanagi <i>et al.</i> , 2006; Yu <i>et al.</i> , 2008 Mata <i>et al.</i> , 2010
2b	A	TEM-1	Yang <i>et al.</i> , 1990
		TEM-3, TEM-4, TEM-24, TEM-47, TEM-52, TEM-149	Kim & Lim, 2005; Naumiuk <i>et al.</i> , 2004; Neuwirth <i>et al.</i> , 2001; Payne <i>et al.</i> , 1991; Perilli <i>et al.</i> , 2008; Petit <i>et al.</i> , 1990
2be	A	SHV-2, SHV-5, SHV-12	Fernandez-Rodriguez <i>et al.</i> , 1992; Garza-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011
		CTX-M-1, CTX-M -2, CTX-M -3, CTX-M -15, CTX-M -22	Baraniak <i>et al.</i> , 2002; Quinteros <i>et al.</i> , 2003; Suh <i>et al.</i> , 2010; Yamasaki <i>et al.</i> , 2002; Yamasaki <i>et al.</i> , 2003
		BES-1	Bonnet <i>et al.</i> , 2000
		GES-1	de Vries <i>et al.</i> , 2006
2d	D	Espectro restrito: OXA-1, OXA -10, OXA-30	Centrón & Roy, 2002; Jones <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2005;
		Cromossomais: SME-1, SME-2, SME-3	Naas <i>et al.</i> , 1994; Queenan <i>et al.</i> , 2000; Queenan <i>et al.</i> , 2006
2f	A	Adquiridas: KPC-2, KPC-3	Deshpande <i>et al.</i> , 2006b; Zhang <i>et al.</i> , 2007
3	B	IMP-1, IMP-4, IMP-6, IMP-8, IMP-10, IMP-11	Hu & Zhao, 2009; Jones <i>et al.</i> , 2004; Lee <i>et al.</i> , 2008; Osano <i>et al.</i> , 1994; Yano <i>et al.</i> , 2001; Zhao <i>et al.</i> , 2007
		VIM-2, VIM-11	Lee <i>et al.</i> , 2008; Yum <i>et al.</i> , 2002

<sup>a</sup> Algumas variantes apresentam maior atividade contra cefalosporinas de amplo espectro e carbapenems, ESAC (cefalosporinas de espectro ampliado).  
pAmpC: AmpC plasmidial.

### 3.3.1 Metallo- $\beta$ -lactamases

As metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) são enzimas que apresentam potente atividade contra carbapenems, mas diferem de outras carbapenemases em três

principais aspectos: (i) requerem íons  $Zn^{+2}$  ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo; (ii) são resistentes à ação dos inibidores das serino- $\beta$ -lactamases, embora sofram inibição por agentes quelantes (EDTA, derivados de tiol e do ácido dipicolínico); (iii) não hidrolisam o monobactam aztreonam (Walsh *et al.*, 2005).

Algumas MBLs são produzidas constitutivamente por espécies bacterianas, como *Bacillus cereus*, *Bacteriodes fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Elizabethkingia meningoseptica* (anteriormente denominado *Chryseobacterium meningosepticum*) (Nordmann & Poirel, 2002). Entretanto, a aquisição de MBLs vem sendo descrita desde o início da década de 90 em patógenos clinicamente mais importantes, como enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Entre as classes de MBLs adquiridas, apenas IMP e VIM foram identificadas em amostras de *S. marcescens* (Livermore & Woodford, 2006).

A primeira descrição de MBL adquirida foi a enzima IMP (*imipenemase*), isolada de *S. marcescens* no Japão, em 1991 (Osano *et al.*, 1994). Diversas variantes dessa enzima foram então descritas em enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. de praticamente todos os continentes (Walsh *et al.*, 2005; Walsh, 2008). As variantes IMP-1, -4, -6, -8, -10 e -11 já foram reportadas em isolados clínicos de *S. marcescens*, sendo que IMP-6 foi originalmente descrita a partir de um isolado de *S. marcescens* (Hu & Zhao, 2009; Jones *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Osano *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007).

Em 1999, a segunda classe de MBL adquirida descrita foi denominada VIM (*Verona imipenemase*). Essa enzima foi observada em uma amostra de *P.*

---



*aeruginosa* originária de Verona, Itália (Lauretti *et al.*, 1999). Em *S. marcescens*, apenas VIM-2 e VIM-11 já foram identificadas até o momento (Lee *et al.*, 2008; Yum *et al.*, 2002).

A terceira subclasse de MBL adquirida, SPM-1 (São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase), foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em 2001, recuperada do trato urinário de uma criança hospitalizada no Complexo do Hospital São Paulo (Toleman *et al.*, 2002). Essa enzima parece ocorrer de forma endêmica no Brasil e, especificamente, em isolados de *P. aeruginosa*, pois, até o momento, não foi encontrada em outras espécies bacterianas (Gales *et al.*, 2003; Zavascki *et al.*, 2005).

A quarta subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1 (German imipenemase), foi descrita em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Dusseldorf, Alemanha, em 2002 (Castanheira *et al.*, 2004b). Em 2005, foi descrita uma nova MBL adquirida em isolados clínicos de *A. baumannii* na Coreia, denominada SIM-1 (Seul imipenemase) (Lee *et al.*, 2005). Mais recentemente, foram descritas novas subclasses de MBLs adquiridas: AIM-1 (Australian imipenemase), recuperada de um isolado clínico de *P. aeruginosa*, em 2007, na Austrália (Yong *et al.*, 2007); KHM-1 (Kyorin Health Science metalo- $\beta$ -lactamase), descrita em 2008, no Japão, em um isolado clínico de *C. freundii* (Sekiguchi *et al.*, 2008); NDM-1 (MIM-1) (New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase), descrita em 2008, na Índia, em um isolado clínico de *K. pneumoniae* (Yong *et al.*, 2009); DIM-1 (Dutch Imipenemase), enzima descrita em um isolado de *P. stutzeri* em 2010 (Poirel *et al.*, 2010c) e TMB-1 (Tripoli MBL), recuperada de um isolado clínico de *P. aeruginosa* detectado da

---

Libia (África) em 2008 (El Salabi *et al.*, 2009). Nenhuma destas novas classes de metalo- $\beta$ -lactamases foram descritas em *S. marcescens* até o momento.

### 3.3.2 Serino-Carbapenemases

As carbapenemases classificadas no grupo funcional 2f (Bush & Jacoby, 2010), e classe molecular A (Ambler, 1980) apresentam resíduos serina em seus sítios ativos, são sensíveis à ação dos inibidores de serino- $\beta$ -lactamases e são capazes de hidrolisar os carbapenens. As enzimas SME, IMI, NMC-A, KPC e GES estão incluídas neste grupo sendo que destas, somente SME, KPC e GES foram descritas em *S. marcescens* (Queenan & Bush, 2007; Walther-Rasmussen & Hoiby, 2007).

A enzima SME-1 (*Serratia marcescens* enzyme) foi a primeira  $\beta$ -lactamase do tipo carbapenemase pertencente à classe molecular A a ser descrita. Esta carbapenemase foi identificada em um isolado clínico de *S. marcescens* recuperado em Londres, em 1994 (Naas *et al.*, 1994). Subsequentemente, três variantes com diferenças de 1 a 2 aminoácidos entre suas sequências foram descritas, exclusivamente em isolados de *S. marcescens* (Walther-Rasmussen & Hoiby, 2007). SME-2 e SME-3 foram identificadas em isolados provenientes dos EUA, em 2000 e 2006, respectivamente (Queenan *et al.*, 2000; Queenan *et al.*, 2006). Relatos da produção de enzimas do tipo SME estão restritos, até o momento, aos EUA, Canadá, Suíça e Reino Unido (Poirel *et al.*, 2007b; Walther-Rasmussen & Hoiby, 2007). As  $\beta$ -lactamases do tipo SME são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano, cuja expressão pode ser induzida. As cepas bacterianas que expressam tais enzimas apresentam redução da

---

sensibilidade ou resistência aos carbapenems associado à sensibilidade às cefalosporinas de espectro estendido (Queenan & Bush, 2007).

A primeira descrição da enzima KPC-1 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ocorreu nos EUA, no ano de 2001, a partir de um isolado de *K. pneumoniae* coletado em 1996. Desde então, onze variantes foram descritas (<http://www.lahey.org/studies>). No entanto, uma correção na sequência de nucleotídeos do gene *bla*<sub>KPC-1</sub> indicou que as enzimas KPC-1 e KPC-2 são idênticas (Yigit *et al.*, 2001). Até o momento, as variantes KPC-2 e KPC-3 foram encontradas em isolados clínicos de *S. marcescens* provenientes dos da China, isolados em 2006, e dos Estados Unidos, isolados entre 1999 e 2005, respectivamente (Deshpande *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2007).

As carbapenemases do tipo OXA também apresentam resíduos de serina em seus sítios ativos e são classificadas no grupo funcional 2df (Bush & Jacoby, 2010), e classe molecular D (Ambler, 1980). São fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas pelo cloreto de sódio. Podem ocorrer naturalmente em alguns organismos Gram-negativos, assim como podem ser adquiridas pela transferência de material genético. Nesse último caso, as carbapenemases do tipo OXA são designadas com a sigla CHDLs, por “Carbapenem-Hidrolising class D  $\beta$ -Lactamases” (Poirel *et al.*, 2010b).

As CHDLs apresentam capacidade de hidrolisar carbapenems, mas não apresentam atividade sobre aztreonam e cefalosporinas de terceira e quarta gerações. Com base na identidade de suas sequências de aminoácidos, essas enzimas podem ser divididas em quatro subgrupos: OXA-23; OXA-24, cuja sequência é idêntica à OXA-40; OXA-58 e OXA-143 (Higgins *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2010b). Até recentemente, a produção de CHDL era restrita a amostras

---

de *Acinetobacter* spp. Entretanto, em 2008, a produção de OXA-40 foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado na Espanha (Sevillano *et al.*, 2009). Em isolados clínicos de *S. marcescens* nunca foram encontradas CDHLs.

### 3.3.2.1 $\beta$ -lactamases do Tipo GES

A primeira descrição de uma  $\beta$ -lactamase do tipo GES ocorreu em 2000 a partir de um isolado de *Klebsiella pneumoniae* recuperado de uma criança de 1 mês de idade em um hospital francês, em 1998, que tinha sido transferida de um hospital da Guiana Francesa. A  $\beta$ -lactamase caracterizada desta cepa foi nomeada GES-1 (Guiana Extended-Spectrum), e devido à sua capacidade em hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira, terceira e quarta gerações, esta enzima foi classificada como uma  $\beta$ -lactamase de espectro estendido, ou ESBL (Poirel *et al.*, 2000; Walther-Rasmussen & Hoiby, 2007). Ainda em 2000, foi descrita uma outra  $\beta$ -lactamase a partir de um isolado de *Enterobacter cloacae* recuperado de um paciente hospitalizado por leucemia na Grécia, em 1999. Esta nova  $\beta$ -lactamase foi denominada IBC-1 (*i*ntegron-*b*orne *c*ephalosporinase), já que seu gene codificador localizava-se inserido em um integron de classe 1, e também foi classificada como ESBL devido às características apresentadas (Giakkoupi *et al.*, 2000). Análises posteriores demonstraram que IBC-1 possuía apenas um aminoácido diferente em relação à sequência de GES-1 (lisina ao invés de glutamato na posição 104 de Ambler), tratando-se, portanto, de uma mesma família de  $\beta$ -lactamases. A nomenclatura das enzimas do tipo GES e IBC passou por inúmeras revisões, e o consenso atual utiliza a sigla “GES” seguida de um número para designar tais

---

enzimas (Lee & Jeong, 2005). Atualmente, a enzima IBC-1 é conhecida como GES-7.

Em 2001, na África do Sul, foi identificada uma nova variante da família GES em um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, a enzima GES-2, que diferia de GES-1 por uma única substituição de aminoácidos, de glicina por asparagina na posição 170 de Ambler. Devido a esta mutação, o espectro de ação da GES-2 passou a incluir os carbapenems (Poirel *et al.*, 2001). A análise cinética de GES-2 demonstrou que sua eficiência catalítica frente ao imipenem apresentava-se 100 vezes superior àquela exibida por GES-1, embora fosse 1000 vezes inferior àquelas demonstradas por SME-1 e NMC-A (Nordmann & Poirel, 2002).

Até o momento, a família GES possui 15 variantes, que diferem entre si por um a três aminoácidos em suas sequências ([www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/)). Em 2001, foi descrita a IBC-2, posteriormente denominada GES-8, que também apresentava características ESBL e diferia por 1 aminoácido da sequência de GES-1 e de IBC-1 (Mavroidi *et al.*, 2001). Em 2004, o mesmo grupo de pesquisadores identificou duas novas variantes desta família, GES-3 e GES-4, em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. GES-4 apresentava uma única substituição de aminoácido em relação à sequência de GES-3, de uma glicina por uma serina na posição 170 de Ambler. GES-4 apresentava atividade carbapenemase, enquanto GES-3 não, fortalecendo a hipótese da importância da substituição de aminoácidos nesta posição para o aumento do espectro de atividade aos carbapenems nas  $\beta$ -lactamases tipo GES (Wachino *et al.*, 2004a; Wachino *et al.*, 2004b). Ainda em 2004, Vourli e colaboradores identificaram as variantes GES-5 e GES-6 em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *K.*

---

*pneumoniae*, respectivamente, provenientes de um hospital grego. Ambas apresentavam atividade hidrolítica frente aos carbapenens. A enzima GES-5 apresentava apenas a substituição na posição 170 de Ambler (de uma glicina por uma serina) responsável pela atividade carbapenemase quando comparada à GES-1. Esta mesma substituição estava presente na enzima GES-6, que, no entanto, diferia da enzima GES-5 por uma substituição de glutamato por lisina na posição 104 (Vourli *et al.*, 2004). Em 2005, foi descrita a GES-9, a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, com características ESBL. Esta enzima, que possuía uma única substituição de uma glicina por uma serina na posição 243 de Ambler em relação à sequência de GES-1, apresentava atividade hidrolítica aumentada frente ao aztreonam (Poirel *et al.*, 2005). Da mesma forma, GES-11, descrita em 2009 a partir de um isolado clínico de *Acinetobacter baumannii*, também apresentava maior atividade hidrolítica frente ao aztreonam e apresentava uma única substituição de aminoácido em relação à GES-1 na posição 243 de Ambler. Entretanto, diferentemente de GES-9, em GES-11 foi observada a substituição da glicina por uma alanina nesta posição (Moubareck *et al.*, 2009). GES-13 foi descrita em 2010 a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa*, e apresentava duas substituições de aminoácidos em relação à GES-1: glutamato por lisina na posição 104 de Ambler, levando a um aumento da hidrólise do aztreonam, assim como GES-3 e GES-7(IBC-1), e glicina por asparagina na posição 170 de Ambler, assim como GES-2. No entanto, apesar de apresentar a substituição que confere atividade carbapenemase em GES-2, este comportamento não foi observado em GES-13, e os autores sugerem que isso possa ser resultado de um contra-efeito provocado pela substituição do glutamato na posição 104 (Kotsakis *et al.*,

---

2010b). GES-14 foi identificada em isolados clínicos de *A. baumannii*, em 2010. Esta variante apresentou atividade carbapenemase e as substituições já relatadas em outras variantes de glicina por serina na posição 170 de Ambler, e glicina por alanina na posição 243 de Ambler, em relação à sequência de GES-1. No entanto, não foi observada a esperada hidrólise aumentada do aztreonam ocasionada pela substituição na posição 243 devido ao contra-efeito da substituição na posição 170, segundo os autores (Bogaerts *et al.*, 2010). Embora os trabalhos ainda não tenham sido publicados, a análise das sequências inseridas no PUBMED das enzimas GES-12 e GES-15 revela que GES-12 possui a substituição de glicina por alanina na posição 243 de Ambler, que normalmente confere hidrólise aumentada do aztreonam, enquanto GES-15 possui a substituição de glicina por serina na posição 170 de Ambler, que confere atividade carbapenemase. Porém ainda não há dados sobre os parâmetros cinéticos destas enzimas (Número de acesso no GenBank FN554543 e GU208678). Os dados referentes às primeiras descrições das variantes de  $\beta$ -lactamase do tipo GES estão sumarizados na Tabela 2.

Embora microorganismos produtores de GES já tenham sido descritos em diferentes partes do mundo, as  $\beta$ -lactamases do tipo GES não são reportadas com frequência e sua incidência permanece relativamente baixa. Já foram identificadas na África do Sul, Argentina, Bélgica, Brasil, Canadá, China, Coreia, Coreia do Sul, Espanha, França, Grécia, Guiana Francesa, Holanda, Japão, Polônia, Portugal, Reino Unido e Suíça. Estas enzimas têm sido frequentemente associadas com ocorrências únicas, embora pequenos surtos provocados por microorganismos produtores de GES também já tenham sido relatados (de Vries *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2005; Picão *et*

---

*al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2002b). No Brasil, apenas as variantes GES-1, GES-5 e GES-7 foram identificadas. GES-1 e GES-5 foram encontradas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, e GES-7 foi encontrada apenas uma única vez em *K. pneumoniae* (Carvalhaes *et al.*, 2010; Castanheira *et al.*, 2004a; da Fonseca *et al.*, 2007; Dropa *et al.*, 2010; Pellegrino *et al.*, 2006; Picão *et al.*, 2009; Picão *et al.*, 2010).

As  $\beta$ -lactamases do tipo GES são mais frequentemente descritas em isolados clínicos de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, embora também já tenham sido identificadas em *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Recentemente, Girlich e colaboradores descreveram uma amostra de *Aeromonas veronii* produtora de GES-7 isolada de amostras de água do Rio Sena, em Paris (França), sugerindo um reservatório aquático para tais genes (Girlich *et al.*, 2011), embora também seja possível a contaminação do ambiente por bactérias resistentes.

Os genes codificadores de GES são quase sempre encontrados na forma de genes cassetes inseridos em integrons de classe 1 (Kotsakis *et al.*, 2010b). Entretanto, exceções a este fato foram descritas: em 2006, na Grécia, onde foi descrito um isolado de *E. coli* na qual o gene *bla*<sub>GES-7</sub> estava localizado no cromossomo bacteriano (Galani *et al.*, 2006); em 2009, no Canadá, onde foi descrito um isolado de *E. cloacae* que apresentava o gene *bla*<sub>GES-5</sub> inserido em um novo elemento genético nomeado “integron mobilization unit” (IMU) (Poirel *et al.*, 2009); e em 2003 e 2010, em Portugal e na Suíça, respectivamente, onde foram descritos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* que possuíam o gene *bla*<sub>GES-1</sub> como parte de integrons de classe 3 (Correia *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2010a).

---



**Tabela 2.** Primeiras descrições de  $\beta$ -lactamases do tipo GES. Variante descrita, classificação da enzima quanto ao perfil hidrolítico, localização do gene *bla*<sub>GES</sub>, microorganismo no qual o gene foi encontrado, ano de isolamento e referência do estudo.

Enzima	Tipo	Localização <i>bla</i> <sub>GES</sub>	Microorganismo	País	Ano de Isolamento	Referência
GES-1	ESBL	Plasmidial	<i>K. pneumoniae</i>	Guiana Francesa	1998	Poirrel <i>et al.</i> , 2000
GES-2	Carbapenemase	Plasmidial	<i>P. aeruginosa</i>	África do Sul	2000	Poirrel <i>et al.</i> , 2001
GES-3	ESBL	Plasmidial	<i>K. pneumoniae</i>	Japão	2002	Wachino <i>et al.</i> , 2004
GES-4	Carbapenemase	Plasmidial	<i>K. pneumoniae</i>	Japão	2002	Wachino <i>et al.</i> , 2004
GES-5	Carbapenemase	Plasmidial	<i>E. coli</i>	Grécia	— <sup>a</sup>	Vourli <i>et al.</i> , 2004
GES-6	Carbapenemase	Plasmidial	<i>K. pneumoniae</i>	Grécia	— <sup>a</sup>	Vourli <i>et al.</i> , 2004
GES-7 (IBC-1)	ESBL	Plasmidial	<i>E. cloacae</i>	Grécia	1999	Giakkoupi <i>et al.</i> , 2000
GES-8 (IBC-2)	ESBL	Cromossomal	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia	1998	Mavroidi <i>et al.</i> , 2001
GES-9	ESBL	Cromossomal	<i>P. aeruginosa</i>	França	2004	Poirrel <i>et al.</i> , 2005
GES-10	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	Assigned
GES-11	Carbapenemase	Plasmidial	<i>A. baumannii</i>	França	2008	Moubareck <i>et al.</i> , 2009
GES-12	Carbapenemase	— <sup>a</sup>	<i>A. baumannii</i>	Reino unido	— <sup>a</sup>	GenBank nº FN554543
GES-13	ESBL	Cromossomal	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia	2007/2008	Kotsakis <i>et al.</i> , 2010
GES-14	Carbapenemase	Cromossomal	<i>A. baumannii</i>	Bélgica	2008/2009	Bogaerts <i>et al.</i> , 2010
GES-15	— <sup>a</sup>	Plasmidial	<i>P. aeruginosa</i>	Polônia	— <sup>a</sup>	GenBank nº GU208678
GES-16	Carbapenemase	Plasmidial	<i>S. marcescens</i>	Brasil	2005	Este estudo

<sup>a</sup> Dado não fornecido na referência.

### 3.4 Integrans

Os genes de resistência estão comumente localizados em estruturas genéticas que possuem grande plasticidade, isto é, possuem a capacidade de movimentação, seja dentro do próprio genoma de uma bactéria, como entre genomas de bactérias diferentes. Dessa forma, os elementos genéticos móveis ou mobilizáveis, como integrans e transposons, atuam na transmissão horizontal de genes, facilitando a disseminação de genes de resistência (Hall, 1997).

Os integrans são elementos genéticos versáteis que possuem como característica principal a capacidade de inserir, excisar e rearranjar cassetes gênicos, através de um sistema de recombinação sítio-específico. Foram identificados pela primeira vez em 1989, por Stokes & Hall, e desde então já foram encontrados em uma grande diversidade de contextos genéticos, em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Rowe-Magnus & Mazel, 2001; Stokes & Hall, 1989). Embora não possuam autonomia de movimentação, os integrans estão frequentemente associados a outros elementos genéticos móveis, como, transposons e/ou plasmídeos conjugativos, adquirindo assim grande importância como veículos de transmissão de material genético intra- e inter-espécies. Além disso, sua capacidade de acumular genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos também é um importante fator na disseminação dos genes de resistência bacteriana (Partridge *et al.*, 2009).

Os genes cassetes são elementos genéticos formados normalmente por uma única ORF - um gene de resistência, por exemplo - e por um sítio de recombinação sítio-específico, chamado *attC* ("cassette attachment"). Embora

---

os cassetes gênicos sejam mais comumente encontrados inseridos em integrons, eles também podem existir na forma livre como moléculas circulares covalentemente fechadas. Entretanto, por não possuírem capacidade de replicação, os cassetes livres são estruturas transientes (Hall & Collins, 1998; Partridge *et al.*, 2009).

A estrutura básica dos integrons é formada por uma região conservada, denominada 5'CS ("conserved segment"), seguida por uma região variável em tamanho e sequência, que contém os cassetes gênicos. A região 5' CS é formada por um gene codificador de uma recombinase sítio-específica da família das integrases, denominada *IntI*, e por um sítio de recombinação à jusante do gene da integrase, denominado *attI* ("integrase attachment"). A integrase reconhece este sítio de recombinação, e insere os cassetes gênicos nesta região. Um promotor que dirige a expressão dos cassetes inseridos no integron, atualmente conhecido como  $P_c$ , e anteriormente denominado  $P_{ant}$ , é parte do gene da integrase e está localizado à montante do *attI*, fazendo dos integrons um sistema de aquisição e expressão de cassetes gênicos (Figura 1) (Hall & Collins, 1998; Stokes & Hall, 1989).

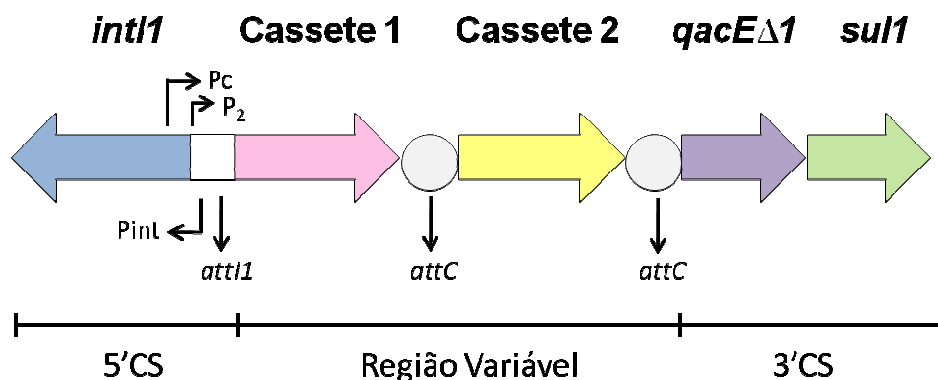
Os integrons podem ser classificados em diferentes classes, de acordo com a estrutura do gene da integrase presente no sistema. Mais de 90 classes de integrons já foram identificadas até o momento. Embora os genes de resistência sejam comumente encontrados em integrons de classe 1, 2 e 3, os integrons de classe 1 são os mais frequentemente detectados, e portanto os mais estudados e caracterizados (Rowe-Magnus & Mazel, 2001).

Os integrons de classe 1 são formados por duas regiões conservadas flanqueando a região variável que comporta os cassetes gênicos. Isto é, além

---

da região 5'CS, característica dos integrons, os integrons de classe 1 possuem adicionalmente uma região conservada à jusante da região onde estão inseridos os cassetes gênicos. Esta região é conhecida como 3'CS, e é normalmente formada por um gene que confere resistência a compostos de amônio quaternário denominado *qacEΔ1*, truncado a um gene que confere resistência à sulfonamida, denominado *sul1* (Figura 1) (Hall & Collins, 1998; Recchia *et al.*, 1994).

A região 5'CS dos integrons de classe 1 contém o gene codificador da integrase, *IntI1*, e o sítio de recombinação, *attI1*, características de todos os integrons. O gene da integrase *IntI1* é codificado pela fita complementar, sendo transcrito no sentido oposto ao dos cassetes inseridos, a partir de um promotor específico denominado  $P_{int}$ , localizado na região correspondente ao *attI1* (Figura 1) (Hall & Collins, 1998; Stokes & Hall, 1989).

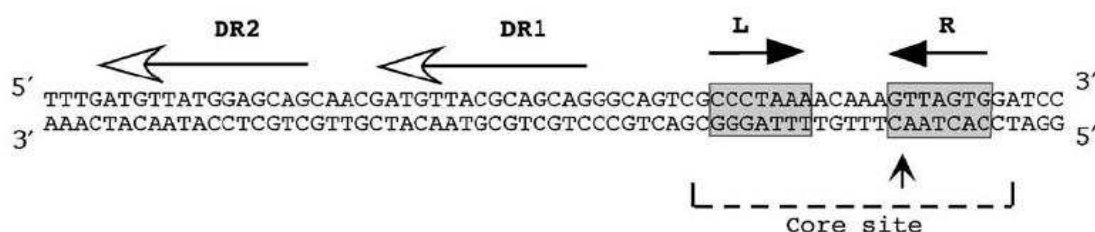


**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1. Os segmentos 5'CS e 3'CS estão representados com seus respectivos genes, e a região variável presente entre eles com dois cassetes gênicos. As setas largas indicam as ORFs, bem como o sentido da transcrição dos genes. O quadrado branco representa o sítio de recombinação da integrase *attI1*, enquanto os círculos representam os sítios de recombinação dos cassetes gênicos, *attC*. Os promotores  $P_c$ ,  $P_2$  e  $P_{int}$  estão indicados. CS: Sequência Conservada; ORF: Open Reading Frame. Adaptado de da Fonseca, 2009 – Tese de Doutorado.

Além do promotor  $P_c$  que controla a transcrição dos cassetes inseridos no integron, alguns integrons possuem também um segundo promotor,  $P_2$  (Figura 1). Este promotor se torna ativo pela adição de três resíduos G entre os

consensos -35 e -10, aumentando a região espaçadora de 14 para 17 pares de bases (pb). Entretanto, na maioria dos integrons identificados o P<sub>2</sub> é inativo (Collins & Hall, 1995).

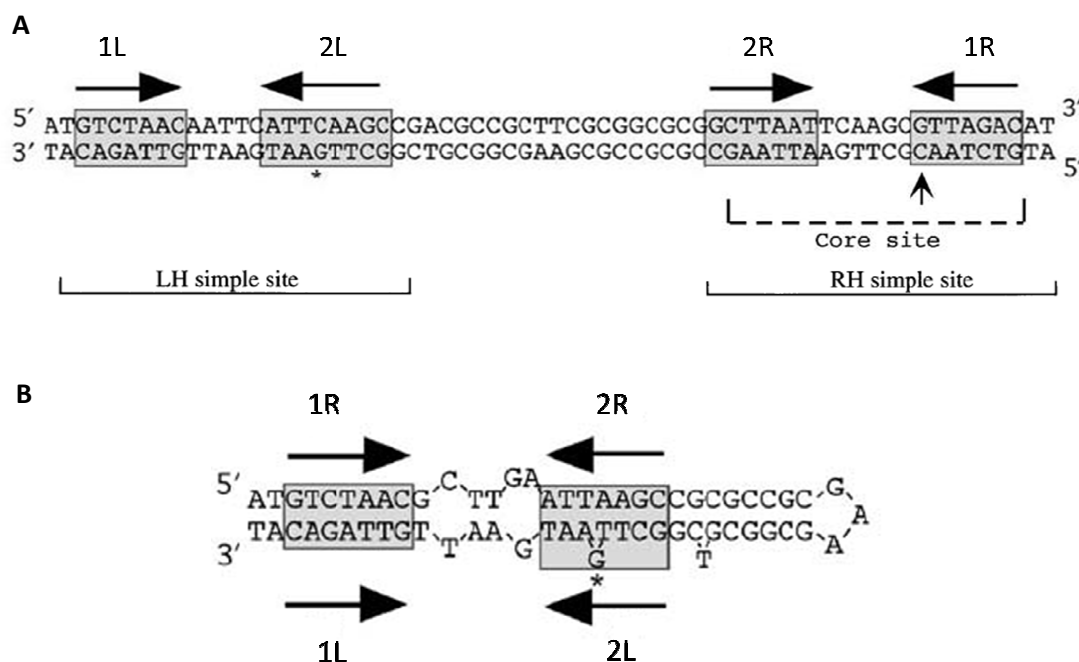
O sítio de recombinação *attI1*, localizado à jusante do gene codificador da integrase *IntI1*, possui um sítio simples e dois domínios de ligação da integrase, DR1 e DR2 (Figura 2). O sítio simples é formado por 2 domínios, L e R, dispostos em orientação inversa e separados por uma região de aproximadamente 5 ou 6 pb. O domínio R, região onde ocorre a recombinação catalisada pela integrase, é formado pela sequência consenso de 7 pb GTTRRRY, onde R corresponde a bases purínicas e Y corresponde a bases pirimidínicas. A recombinação ocorre precisamente entre o G e o TT do triplete GTT deste sítio. O domínio DR1 trata-se de um domínio no qual, geralmente, a integrase se liga fracamente, enquanto DR2 trata-se de um domínio de ligação forte da integrase. Estes domínios são sequências repetidas dispostas na mesma orientação, localizados à montante do sítio simples, que atuam como potencializadores do evento de recombinação por manter a integrase nas proximidades do sítio simples, onde ocorre a recombinação (Collins *et al.*, 1998; Partridge *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Representação da estrutura do sítio de recombinação *attI1*. Os domínios L e R do sítio simples estão destacados em cinza e identificados por setas horizontais preenchidas que indicam a direção da repetição entre as sequências. A seta vertical indica o ponto em que ocorre a recombinação sítio-específica. Os domínios DR1 e DR2 estão indicados por setas horizontais sem preenchimento e são formados por sequências de repetição diretas, demonstrado pelo sentido das setas. Adaptado de Bouvier *et al.*, 2005.

Os sítios *attC* dos *cassetes* gênicos podem diferir quanto à sequência e ao tamanho, variando de 57 a 141 pb; porém, possuem regiões mais conservadas em suas estruturas. Estas regiões compreendem aproximadamente 20 pb em cada extremidade, e estão relacionadas a sequências consenso. Trata-se de sequências de repetição invertidas entre si, separadas por uma região de tamanho e sequência variáveis, que normalmente também são sequências de repetição invertidas. Cada uma dessas regiões compreende um sítio simples, denominados LH (*left hand*) e RH (*right hand*). Cada sítio simples é composto por dois domínios de ligação da integrase dispostos em orientação inversa separados por uma região de aproximadamente 5 ou 6 pb, sendo que os domínios do sítio LH são denominados L1 e L2, e os domínios do sítio RH são denominados R1 e R2. As regiões mais conservadas do *attC* são a sequência consenso de 7 pb GTTRRRY que compõe o R1 do domínio RH, e a sequência inversa ao consenso RYYAAC, que compõe o L1 do domínio LH. A recombinação no *attC* ocorre no domínio R1, entre o G e o TT do triplete GTT da sequência consenso. De fato, a única característica compartilhada entre *attI1* e *attC* é a sequência consenso de 7 pb GTTRRRY, onde ocorre o evento de recombinação entre os dois sítios. Diferentemente dos outros domínios, L2 é formado por 8 pb, e portanto trata-se de uma sequência imperfeita de repetição invertida em relação à R2 (Figura 3). Entretanto, acredita-se que esta base excedente em L2 seja responsável pela inserção do *cassete* no *integron* na correta orientação para que ele seja expresso por  $P_c$ , já que somente são expressos os *cassetes* inseridos em fase com o promotor (Stokes *et al.*, 1997).

---



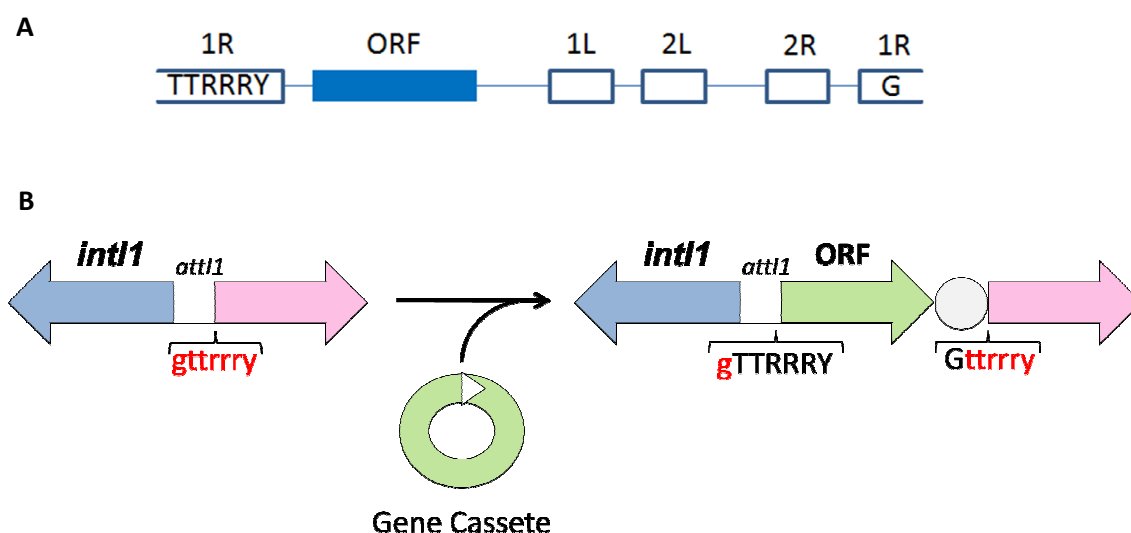
**Figura 3.** Representação das estruturas primárias e secundárias do sítio de recombinação *attC*. (A) Estrutura primária do *attC*. Os domínios de ligação da integrase 1L, 2L, 1R e 2R estão destacados em cinza, formando os sítios simples LH e RH. Setas horizontais indicam a direção das sequências de repetição invertidas imperfeitas que formam estes domínios. A base G protuberante presente no domínio 2L em relação à 2R está indicada por um asterisco. A seta vertical indica o ponto em que ocorre a recombinação sítio-específica. (B) Estrutura secundária em forma de grampo formada pelo pareamento 1R-1L e 2R-2L quando o *attC* se encontra em fita simples. LH: Left-Hand; RH: Right-Hand. Adaptado de Bouvier *et al.*, 2005.

Devido à natureza do evento de recombinação sítio-específica que leva à integração do cassete circular livre, uma pequena parte do *attC* associado ao cassete é encontrado no início do cassete linearizado (parte do domínio 1R), e o restante fica à jusante do gene (domínios 1L, 2L, 2R e parte do domínio 1R). As primeiras seis bases de cada cassete integrado são derivadas do domínio 1R do *attC* e possuem a sequência TTRRRY. A última base da sequência do cassete integrado, também derivada do domínio 1R, trata-se de um G. Dessa forma, após a integração do cassete no integron é formado um R1 composto, formados por 1 base do *attI1* (G) e por 6 bases do *attC* (TTRRRY) à montante do gene (Figura 4) (Collins *et al.*, 1993; Hall & Collins, 1998).

Bouvier *et al.* (2005) demonstraram que a integrase liga-se ao *attI1* dupla-fita, enquanto esta enzima liga-se ao *attC* simples-fita, particularmente à

fita complementar. Devido à natureza dos domínios L1, L2, R1 e R2 (sequências de repetição invertidas entre si), a fita-simples codificadora do *attC* pode assumir uma estrutura secundária em forma de grampo, importante para o evento de recombinação (Figura 3) (Bouvier *et al.*, 2005).

A maioria dos genes cassetes é desprovida de promotores, e portanto, a expressão dos cassetes inseridos no integron é dirigida por  $P_c$ , e eventualmente por  $P_c + P_2$ . Já foram descritas diferentes versões de  $P_c$ , e alguns trabalhos avaliaram as diferentes variantes em relação à força promotora (Collins & Hall, 1995; Le'vesque *et al.*, 1994; Papagiannitsis *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo de inserção dos cassetes gênicos na região variável do integron. (A) Estrutura do cassette em sua forma linear, quando está inserido no integron. A região codificante está representada por um retângulo azul, e os domínios 1L, 2L, 1R e 2R do *attC* estão representados por retângulos brancos. Nesta forma linear, o domínio 1R de 7pb (sítio *core*), GTTRRRY, onde ocorre a recombinação, encontra-se dividido, sendo que apenas a primeira base (G) encontra-se à 3' do cassette, e o restante da sequência (TTRRRY) encontra-se à 5' do cassette. (B) A recombinação entre os sítios *attI1* e *attC* leva à linearização do cassette e formação de sítios *core* compostos. Neste esquema está representada a configuração dos sítios *core* após inserção do cassette. ORF: Open Reading Frame. Adaptado de da Fonseca, 2009 – Tese de Doutorado.



Os cassetes inseridos no integron localizados mais próximos do *attC*, e consequentemente do  $P_c$ , são mais expressos do que os cassetes localizados mais distalmente, e quanto mais longe o cassete estiver de  $P_c$ , menor é a sua expressão. Acredita-se que isto se dá devido à formação da estrutura secundária em forma de grampo do *attC*, impedindo assim a progressão do ribossomo ao longo do mRNA e interferindo na expressão de cassetes à jusante do sítio *attC* (Collins & Hall, 1995; Jacquier *et al.*, 2009).

A tradução eficiente de genes normalmente requer a presença de uma região iniciadora de tradução (TIR) localizada na região 5' não traduzível do cassete, formada por um códon de iniciação, uma sequência de Shine Delgarno (SD), e um espaçamento adequado entre elas (6 a 10 pb). Entretanto, aproximadamente 20% dos cassetes gênicos não possuem uma TIR. Em integrons de classe 1 a tradução de cassetes TIR-deficientes tem sido associada à tradução acoplada de uma ORF localizada no final do segmento 5'CS, que codifica 11 ou 18 aminoácidos, dependendo da formação ou não de um códon de parada (bases sublinhadas) no sítio *core* de 7 pb do primeiro cassete inserido no integron GTTRRRY após o evento de recombinação entre *attI1* e *attC*. Portanto esta ORF é responsável pelo recrutamento de ribossomos e expressão dos cassetes TIR-deficientes, quando presente. A tradução do cassete ocorre de forma acoplada à tradução da ORF, de forma que após a tradução da ORF o ribossomo não se desliga do RNA mensageiro (mRNA), levando ao reinício da tradução no códon de iniciação do cassete, por fusão traducional (Depardieu *et al.*, 2007; Hanau-Berçot *et al.*, 2002; Jacquier *et al.*, 2009).

---

O elemento genético “integron mobilization unit” (IMU), ao qual estava associado o gene *bla*<sub>GES-5</sub> em um isolado de *E. cloacae*, foi identificado em 2009, no Canadá. Duas cópias deste elemento foram encontradas em orientações opostas que englobavam um integron de classe 1 defeutivo contendo o gene *bla*<sub>GES-5</sub>, formando uma estrutura composta provavelmente responsável pela mobilização deste integron defeutivo. As duas cópias do elemento identificado eram compostas por 288 pb repetidas e invertidas entre si, e apresentavam sequências de repetição invertidas imperfeitas de 39 pb em suas extremidades. Tais sequências apresentavam similaridade com a sequência de inserção ISSod9, que pertence à família de transposons Tn3. No entanto, os IMUs não possuíam sequência codificadora para nenhuma ORF, incluindo a integrase. Mesmo assim, a estrutura composta, formada pelas duas cópias de IMU com o integron defeutivo presente no meio delas, pode sofrer mobilização por transposição na presença de uma integrase *in trans* (Poirel *et al.*, 2009).

### 3.5 Caracterização de uma Nova $\beta$ -lactamase

Inúmeras  $\beta$ -lactamases têm sido descritas recentemente, e muitas vezes a ausência de informações funcionais sobre estas enzimas dificulta suas corretas classificações. Segundo Bush and Jacoby (2010), a completa caracterização de uma nova  $\beta$ -lactamase deve incluir informações estruturais e funcionais da enzima. Neste trabalho, os autores propõem um conjunto de dados a serem fornecidos na identificação de uma nova  $\beta$ -lactamase: (i) determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para um grupo de antibióticos que defina as propriedades enzimáticas da nova  $\beta$ -lactamase,

---

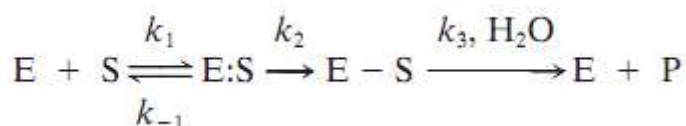
utilizando metodologia preconizada. Devem ser testados o isolado clínico original, um transformante ou transconjugante no qual não estejam presentes genes que codificam outras enzimas, e a cepa utilizada como receptora na transformação ou conjugação, que também não deve possuir nenhuma  $\beta$ -lactamase; (ii) determinação da sequência completa de nucleotídeos e aminoácidos da  $\beta$ -lactamase; (iii) nome da nova  $\beta$ -lactamase, aprovado pelo site <http://www.lahey.org/Studies>; (iv) purificação da nova proteína, com pureza superior a 90% e ausência de atividade  $\beta$ -lactamase não relacionada à proteína em questão; (v) determinação do ponto isoelétrico da nova  $\beta$ -lactamase; (vi) determinação do perfil hidrolítico (determinação das constantes cinéticas  $k_{cat}$  e  $K_m$ ) da enzima frente aos substratos cefaloridina ou cefalotina, benzilpenicilina, cloxacilina ou oxacilina, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, imipenem e aztreonam. Outros substratos específicos devem ser testados, de acordo com as características da nova enzima. Por exemplo, meropenem, ertapenem e/ou doripenem devem ser testados para carbapenemases; (vii) determinação do perfil de inibição da  $\beta$ -lactamase (determinação das constantes de inibição). Devem ser testados os inibidores padrão, como, o ácido clavulânico e o tazobactam, e também o EDTA caso a enzima seja uma metalo- $\beta$ -lactamase (Bush & Jacoby, 2010).

### 3.5.1 Mecanismo de Hidrólise das Serino- $\beta$ -lactamases

As serino- $\beta$ -lactamases utilizam um resíduo de serina no sítio ativo da enzima para hidrolisar a ponte amida do anel  $\beta$ -lactâmico típico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Banerjee *et al.*, 1998). Seguindo o esquema consenso de numeração de Ambler *et al.* (1991), este resíduo de serina localiza-se na

---

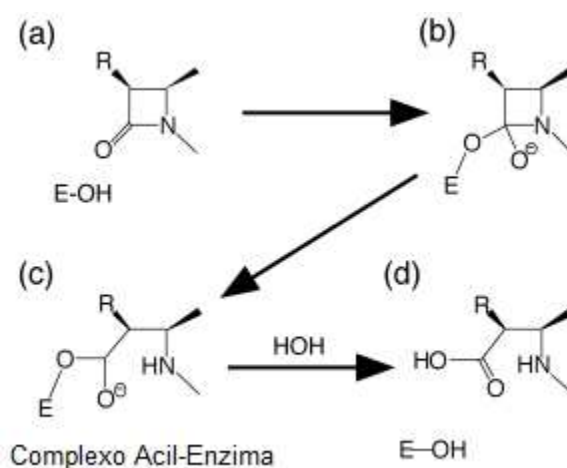
posição 70. Além da Ser70, outros resíduos também possuem papel chave na atividade catalítica da enzima (Banerjee *et al.*, 1998). O mecanismo de hidrólise das serino- $\beta$ -lactamases envolve a acilação dos agentes  $\beta$ -lactâmicos (Figura 6, (a) para (c) via (b)), isto é, a ligação da enzima ao anel  $\beta$ -lactâmico, seguida da deacilação (Figura 6, (c) para (d)), com a utilização de uma molécula de água para hidrolisar o complexo acil-enzima. Deste modo, a molécula de  $\beta$ -lactâmico inativa é liberada juntamente com a molécula de enzima intacta para agir e inativar outras moléculas de  $\beta$ -lactâmicos (Figura 6). Esta reação enzimática pode ser representada pela seguinte equação:



**Figura 5.** Representação esquemática da reação de hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos pelas serino- $\beta$ -lactamases. Neste esquema, E é a enzima  $\beta$ -lactamase, S é o substrato  $\beta$ -lactâmico, E:S é o complexo pré-acilação, E-S é o complexo acil-enzima, e P é o produto ( $\beta$ -lactâmico inativado). As constantes para cada passo desta reação estão representadas por  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  e  $k_3$ , onde  $k_1$  e  $k_{-1}$  são as constantes de associação e dissociação do complexo pré-acilação, respectivamente;  $k_2$  é a constante de acilação; e  $k_3$  é a constante de deacilação (Extraído de Drawz & Bonomo, 2010).

Resumidamente, em  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler, após a formação do complexo pré-acilação, o resíduo de serina 70 do sítio ativo da enzima executa um ataque nucleofílico na carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do antimicrobiano, resultando em um composto intermediário de alta energia (Figura 6b). A seguir, ocorre a protonação do nitrogênio do anel  $\beta$ -lactâmico e quebra da ligação C-N, formando o complexo acil-enzima (Figura 6c). Então, uma molécula de água ataca este complexo covalente formando um intermediário de alta energia, que evolui para a hidrólise da ligação entre a

carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico e o oxigênio da serina nucleofílica, regenerando a enzima e liberando o  $\beta$ -lactâmico inativo (Figura 6d) (Drawz & Bonomo, 2010). Como dito anteriormente, as reações de acilação e deacilação requerem a ativação da serina nucleofílica e da molécula de água hidrolítica, respectivamente. Acredita-se que o resíduo de ácido glutâmico presente na posição 166 atue como base para ativação da molécula de água na deacilação, tendo portanto um papel chave na atividade hidrolítica. Em contrapartida, o mecanismo de acilação não é bem esclarecido, e diversas hipóteses e linhas de evidência tentam explicá-lo (Drawz & Bonomo, 2010).



**Figura 6.** Mecanismo de inativação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelas serino- $\beta$ -lactamases. (a) Agente  $\beta$ -lactâmico. (b) Composto intermediário de alta energia formado após o ataque nucleofílico da serina 70 na carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico. (c) Complexo acil-enzima, formado após protonação do nitrogênio do anel  $\beta$ -lactâmico e quebra da ligação C-N. (d) Deacilação por ataque de uma molécula de água com liberação do  $\beta$ -lactâmico inativo e da molécula de enzima intacta. (Adaptado de Hata *et al.*, 2006).

### 3.5.2 Cinética Enzimática

Para que uma reação enzimática ocorra, é necessário que aconteça o encontro da enzima (E) com o substrato (S) e consequente formação do complexo enzima-substrato (ES). O complexo ES é transiente, e a enzima

pode dissociar-se do seu substrato sem ter ocorrido reação, ou pode transformar o substrato em produto (P), passando por um segundo estado transiente onde é formado um complexo EP. Após dissociação deste complexo, formando o produto (P), a enzima livre é liberada para novas reações. Esta sequência de eventos pode ser representada de forma simplificada por: (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995)

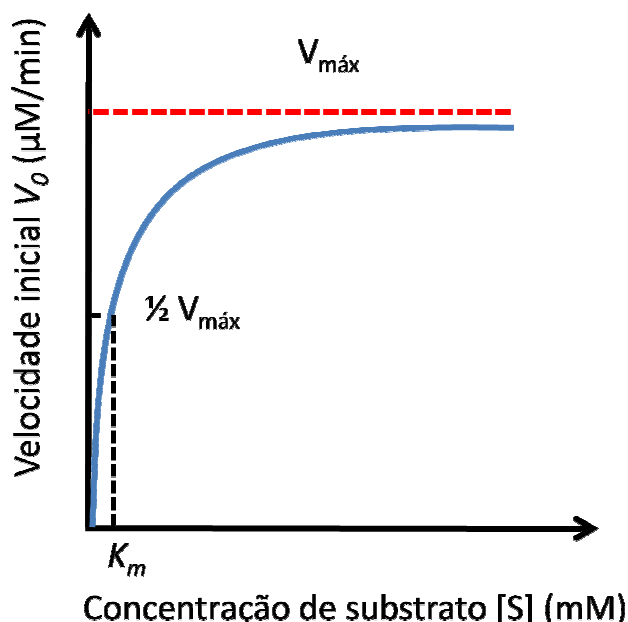


Um dos fatores que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração do substrato [S] presente. O estudo dos efeitos de alterações na concentração de substrato na velocidade da reação é dificultado visto que a concentração de substrato varia durante o curso de uma reação, à medida que parte do substrato é convertida em produto. Uma forma de amenizar este problema é medir a velocidade inicial da reação ( $V_o$ ). Desta forma, em condições experimentais utiliza-se concentrações muito maiores de substrato do que de enzima [E]. Se o tempo de reação é suficientemente curto, as mudanças na concentração de substrato serão insignificantes, podendo ser considerada como uma constante (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

A Figura 7 ilustra o efeito provocado em  $V_o$  pela variação da concentração de substrato, quando a concentração de enzima é mantida constante. Em baixas concentrações de substrato,  $V_o$  aumenta de forma quase linear com os aumentos na concentração de substrato. Em concentrações maiores de substrato,  $V_o$  responde com aumentos cada vez menores aos aumentos na concentração de substrato. Finalmente, é alcançado um estágio a partir do qual ocorrem apenas aumentos mínimos em  $V_o$ , mesmo diante de aumentos significativos na concentração de substrato. Este ponto corresponde

---

à velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da reação, onde ocorre saturação de todas as moléculas de enzima com o substrato e a concentração de enzima livre é insignificante (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).



**Figura 7.** Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente. Por este tipo de gráfico a  $V_{m\acute{a}x}$  pode ser determinada apenas aproximadamente, isto porque  $V_0$  se aproximará progressivamente de  $V_{m\acute{a}x}$ , mas nunca chegará a atingi-la. A concentração de substrato na qual  $V_0$  é a metade de  $V_{m\acute{a}x}$  é o  $K_m$ , a constante de Michaelis-Menten.  $V_0$ : Velocidade inicial;  $V_{m\acute{a}x}$ : Velocidade máxima,  $[S]$ : Concentração de Substrato.

O modelo de Michaelis-Menten é utilizado para explicar a cinética da maioria das enzimas. A curva que expressa a relação entre a concentração de substrato e  $V_0$ , ilustrada na Figura 7, é expressa pela Equação de Michaelis-Menten, definida a partir da hipótese que, nas reações enzimáticas, o passo limitante da velocidade é a quebra do complexo ES para formação de produto e enzima livre (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

A Equação de Michaelis-Menten é a equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato. É uma

expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial  $V_o$ , a velocidade máxima  $V_{m\acute{a}x}$ , e a concentração inicial de substrato  $[S]$ , todas relacionadas através de uma constante de Michaelis-Menten,  $K_m$  (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

$$\text{Equação de Michaelis-Menten: } V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

$K_m$  consiste de várias constantes de velocidade. É equivalente à concentração de substrato na qual  $V_o$  é igual à metade de  $V_{m\acute{a}x}$ , e indica a afinidade de uma enzima por determinado substrato. Quanto menor o valor de  $K_m$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

A constante catalítica  $k_{cat}$ , também chamada de número de *turnover* da enzima, é também utilizada para caracterização da cinética de uma enzima em relação a um determinado substrato. Assim como  $K_m$ ,  $k_{cat}$  é composta por várias constantes de velocidade individuais. No geral este termo corresponde à constante de velocidade da etapa mais lenta da reação.  $k_{cat}$  representa o número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo por molécula da enzima. Assim, quanto maior o valor de  $k_{cat}$  para uma enzima, mais “rápida” será a reação (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

A eficiência catalítica de uma enzima pode ser expressa através da *constante de especificidade*, fornecida pela razão  $k_{cat}/K_m$ . A constante de especificidade relaciona tanto a afinidade da ligação do substrato à enzima como a capacidade catalítica desta, permitindo a comparação entre diferentes

---



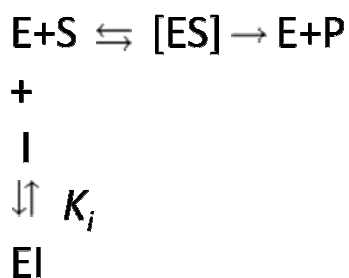
enzimas, ou da mesma enzima com diferentes substratos (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

### 3.5.3 Inibição Enzimática

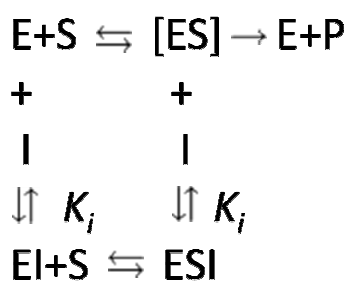
Os inibidores são substâncias que diminuem a velocidade das reações químicas. A inibição enzimática pode ser reversível, competitiva ou não-competitiva, ou irreversível (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

A inibição reversível competitiva ocorre quando um inibidor (I) compete com o substrato por ligação no sítio ativo da enzima livre (E). Os inibidores competitivos são quase sempre estruturalmente semelhantes ao substrato, e combinam-se com a enzima para formar um complexo EI. Durante o tempo em que o inibidor ocupa o sítio ativo da enzima, ele impede a ligação do substrato. Como o inibidor liga-se reversivelmente à enzima, a competição pode se tornar favorável ao substrato pela simples adição de mais substrato ao meio da reação. Quando elevadas concentrações de substrato estiverem presentes, será mínima a probabilidade de se ligar uma molécula de inibidor à enzima. Nestas condições, a reação exibirá uma  $V_{máx}$  normal, mas o valor de  $K_m$  estará aumentado devido à competição entre substrato e inibidor. A inibição reversível é caracterizada por um equilíbrio entre o inibidor e a enzima, definido por uma constante de equilíbrio  $K_i$  (ou constante de dissociação de EI). Assim como  $K_m$ ,  $K_i$  representa a afinidade do inibidor pela enzima (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

---

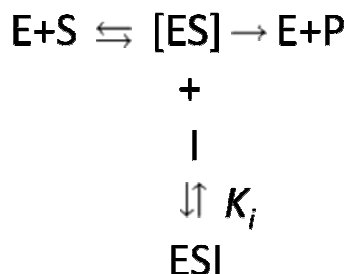


A inibição reversível não-competitiva ocorre quando o inibidor se liga a um sítio diferente daquele em que se liga o substrato. A ligação do inibidor não bloqueia a ligação do substrato, e vice-versa. A enzima é inativada quando o inibidor está ligado a ela, estando o substrato também presente ou não. Uma concentração infinitamente alta de substrato não consegue deslocar o equilíbrio levando todas as moléculas de enzima para a forma ES, que é a forma produtiva. O inibidor abaixa efetivamente a concentração de enzima ativa, e como consequência, diminui a  $V_{\text{máx}}$ . Em geral, o efeito sobre o  $K_m$  é pequeno ou nenhum (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).

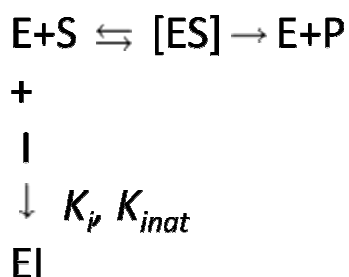


Há ainda um terceiro tipo de inibição reversível, chamada inibição reversível incompetitiva. Trata-se de uma inibição por bloqueio do complexo ES, onde o inibidor liga-se reversivelmente a um sítio diferente daquele em que se liga o substrato na enzima. Porém, o inibidor somente se liga ao complexo ES. O inibidor não permite ao complexo ES evoluir para a formação de produto.

Nesta situação, a presença do inibidor provoca diminuições em  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).



A inibição irreversível ocorre quando o inibidor se combina com um grupo funcional na molécula de enzima que é essencial para sua atividade, podendo até promover a destruição total deste grupamento. É comum a formação de uma união covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima. A presença de um inibidor irreversível provoca uma diminuição em  $V_{m\acute{a}x}$ , já que parte da enzima é completamente removida do sistema, ao passo que  $K_m$  não sofre alteração. Neste caso, além da constante de inibição  $K_i$ , é também determinada uma constante  $K_{inat}$ , que representa a velocidade de inibição, ou seja, o tempo que o inibidor leva para inativar a molécula de enzima irreversivelmente (Devlin, 2007; Lehninger *et al.*, 1995).



## *4. MATERIAL E MÉTODOS*

---

#### 4.1 Amostras Bacterianas

Duas amostras clínicas de *S. marcescens* foram isoladas da corrente sanguínea e da secreção brônquica de dois pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), localizado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, em 2005. Os isolados haviam sido previamente triados como resistentes aos carbapenems pelo Laboratório de Microbiologia do HUPE pela metodologia de disco-difusão, e foram então encaminhados ao Laboratório ALERTA para caracterização dos mecanismos envolvidos neste fenótipo.

Os isolados foram armazenados no banco de microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Disciplina de Infectologia, UNIFESP/EPM, em caldo tríptico de soja (TSB – Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com glicerol a 15% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a -20° C. Os isolados foram retirados do banco de microrganismos e subcultivados por duas vezes em ágar columbia base (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, para garantir a pureza e a viabilidade das colônias bacterianas, antes da realização dos demais testes.

#### 4.2 Tipagem Molecular por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para avaliação da similaridade genética entre os isolados de *S. marcescens*, foi utilizada a técnica de análise do DNA cromossômico por eletroforese de campo pulsado “*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*” – PFGE (Pfaller *et al.* 1992).

---

Foi preparada para ambos isolados de *S. marcescens* uma suspensão bacteriana em 4 mL de caldo TSB (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Após 18-24 horas de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados por 15 minutos. Em seguida, o centrifugado foi diluído em 1 mL de solução salina e transferido para um microtubo de 1,5 mL, de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados à 15.000 rpm por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em solução salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da salina em  $\mu\text{L}$  foi equivalente ao peso do centrifugado em  $\mu\text{g}$ . Um volume de 5  $\mu\text{L}$  desta suspensão celular foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  da solução tampão TEM (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada com 340  $\mu\text{L}$  de agarose de baixa temperatura de fusão ("low melt" – FMC, Rockland, EUA) para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico ("plugs"). Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6 mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01 M ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) à 37°C, e a seguir os plugs foram incubados à 50°C, em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, EUA) numa proporção de 1:1, por um período de 12 horas. Após este período de incubação, os blocos foram lavados com solução CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática, e posterior eletroforese.

---

Foram realizadas lavagens com tampão DNS (MgCl 1M; Tris 1 M, pH 8.0; água destilada). O DNA bacteriano foi digerido com a enzima de restrição SpeI (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, EUA - 10U por amostra), incubado por 12 a 18 horas à 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, EUA) e o padrão de variação da corrente elétrica ("switch time") foi de 5 a 60 segundos. A eletroforese foi realizada por 23 horas, em solução TBE 0,5x (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M) à temperatura de 13°C e corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta.

De acordo com os critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (Tenover *et al.* 1995), os isolados seriam considerados idênticos se apresentassem o mesmo perfil migratório para todas as bandas; seriam considerados semelhantes e pertencentes a um mesmo clone se apresentassem perfil migratório com diferença em até seis bandas; e seriam considerados distintos genotipicamente se apresentassem mais de seis bandas discordantes.

#### **4.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados clínicos de *S. marcescens* SM190 e SM191, por meio da técnica de microdiluição em

---

caldo, seguindo as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI, 2009).

As soluções estoques dos antimicrobianos testados foram preparadas em concentrações 200 vezes superiores às desejadas nas placas de microdiluição, e armazenadas a -70°C até o seu processamento.

A partir da solução estoque, 1 mL de antimicrobiano foi transferido a um tubo contendo 9 mL de caldo Müller-Hinton (MH) (Oxoid; Basingstoke; Inglaterra). Após homogeneização, 1 mL desta solução foi transferido a um novo tubo contendo 9 mL de caldo MH, para diluição da concentração do antimicrobiano em 100 vezes. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas do antimicrobiano. A seguir, foi distribuído 100 µL dessas soluções nos poços da placa de microdiluição utilizando-se uma pipeta multicanal. As placas foram armazenadas em freezer -70°C até a realização dos testes.

Após o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue por 18 horas, com auxílio de uma alça de semeadura 3 a 5 colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo MH, para obtenção de uma concentração bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Uma alíquota de 32 µL da suspensão a 0,5 de McFarland foi transferida para um tubo contendo 968 µL de caldo MH. A seguir, 500 µL desta suspensão foi transferido para um tubo contendo 4,5 mL de caldo MH, para obtenção de uma concentração bacteriana em torno de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após a homogeneização, foi inoculado 100 µL desta suspensão bacteriana em cada poço da placa de microdiluição utilizando-se uma pipeta multicanal, implicando

---



assim em uma diluição 1:2 do inóculo bacteriano e das concentrações de antimicrobianos testadas. A concentração final de bactérias em cada orifício da placa de microdiluição foi de aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL. A seguir, as placas foram incubadas à 35°C, em aerobiose por 18 a 20 horas. Após esse período, a leitura visual das placas de microdiluição foi determinada. As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com os critérios do CLSI (CLSI, 2010).

Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), amicacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil); aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA); cefepima (Bristol-Myers Squibb); ceftazidima (Strides Arcolab, Bangalore, Índia); ciprofloxacina (Fresenius Robi, Alemanha); ertapenem (Merck Sharp, Clermont-Ferrand, França), gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); imipenem (Merck Sharp, Nova Jersey, EUA); meropenem (Astra Zeneca, Londres, Inglaterra) e ticarcilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os antimicrobianos imipenem, meropenem, ertapenem e ticarcilina foram também testados em associação com ácido clavulânico (2 µg/mL com ticarcilina, e 4 µg/mL com carbapenens), segundo as recomendações do CLSI (2009). (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para o controle de qualidade do teste de sensibilidade, as amostras da “American Type Culture Collection” (ATCC®) *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 foram utilizadas.

#### **4.4 Detecção dos Mecanismos de Resistência aos Carbapenens**

##### **4.4.1 Teste de Hidrólise Enzimática do Imipenem**

---

O teste de hidrólise foi utilizado com o objetivo de detectar atividade enzimática contra o imipenem nas amostras bacterianas testadas.

A preparação do inóculo bacteriano foi realizada após o crescimento em placas de ágar MacConkey por 18 horas. Com o auxílio da alça de semeadura, 10 a 15 colônias isoladas de cada amostra foram transferidas para tubos de microcentrifuga contendo 500  $\mu$ L de tampão de amostra (Tris-HCl 1 mM e  $\text{ZnSO}_4$  1mM). Este inóculo foi então ultrasonificado por 30 segundos, quatro vezes, com amplitude de até 40% (Sonics Vibra CellTM; Newtown, EUA), e a seguir centrifugado por 15 minutos à 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras mantidas no gelo até o momento do ensaio.

A solução de antimicrobiano foi preparada com 6 mg de imipenem diluído em 1 mL de água MilliQ estéril, a fim de se obter uma leitura espectrofotométrica em torno de 1 a 1,5 unidades de absorbância em um comprimento de onda de 299 nm.

Para o teste, foi adicionado à uma cubeta de quartzo 940  $\mu$ L de tampão de amostra e 50  $\mu$ L do extrato protéico. Esta mistura foi homogeneizada através de inversão da cubeta e a leitura de absorbância foi zerada. A seguir, 10  $\mu$ L da solução do antimicrobiano foi adicionado à cubeta, e após nova homogeneização, o monitoramento da absorbância foi realizado no espectrofotômetro *Biomate 5 UV Visible* (Termo Spectronic, Cambridge, Inglaterra) por 5 minutos. A diminuição gradativa da absorbância e, portanto, valores negativos de variação de absorbância ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ , calculada através da diferença entre o valor de absorbância final e absorbância inicial após os 5

---

minutos) foram considerados como resultados positivos de hidrólise do imipenem pelo extrato protéico.

#### 4.4.2 Detecção de Genes Codificadores de $\beta$ -lactamases

A detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou multiplex, de acordo com os genes pesquisados.

O DNA das amostras bacterianas foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France), e empregado como o DNA alvo de cada amostra para as reações de PCR.

As reações de PCR foram preparadas em fluxo laminar, contendo *master-mix* (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e oligonucleotídeos (Integrate DNA Technologies, IDT, EUA). Foram pesquisados os genes codificadores de: (a) metalo- $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>); (b) oxacilinases (*bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>), (c) serino- $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SME</sub>), (d) AmpC plasmidiais (*bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> e *bla*<sub>DHA</sub>), (e) integrons de classe 1. Na Tabela 3 estão listadas as cepas controle utilizadas em cada reação. As condições de termociclagem do DNA (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e os oligonucleotídeos iniciadores, selecionados de acordo com os genes pesquisados, estão apresentados na Tabela 4.

---

A revelação dos produtos da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA) a 110V por 40 minutos em tampão TBE 0,5x (89 nM Tris-Borato e 2 mM EDTA pH 8.0). Como marcador de peso molecular, foi utilizado DNA *ladder* 100 pares de base (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sob a luz ultravioleta - 320nm (GelDoc Quantity One; Bio-Rad Laboratories, EUA).

#### **4.4.3 Sequenciamento e Interpretação dos Resultados**

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir da purificação dos produtos obtidos nas reações da PCR, utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi determinada por densidade óptica, em espectrofotômetro digital NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), utilizando 2 µL do DNA total purificado. Após a quantificação, aproximadamente 70 ng de DNA foram submetidos à reação preparatória de sequenciamento, utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI Prism 3130, Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, EUA). As sequências de DNA obtidas e as sequências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa Lasergene Software Package (DNASTar, Madison, EUA) e, então, submetidas à comparação com as sequências depositadas na base de dados genéticos disponíveis na internet

---

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

**Tabela 3.** Cepas controle utilizadas neste estudo para a detecção de genes de resistência, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Cepa e número do banco <sup>a</sup>	Tipo de $\beta$ -lactamase	Classe molecular de Ambler (1980)
<i>P.aeruginosa</i> 233	GES-5	A
<i>K. pneumoniae</i> 308	CTX-M 2	A
<i>K. pneumoniae</i> 307	KPC-2	A
<i>E. coli</i> 282	SHV-5	A
<i>E. coli</i> 248	TEM-1	A
<i>E. coli</i> 394	OXA-2	D
<i>E. coli</i> 392	OXA-10	D
<i>P.aeruginosa</i> 131	IMP-1	B
<i>P.aeruginosa</i> 224	VIM-2	B
<i>P.aeruginosa</i> 151	SPM-1	B
<i>P.aeruginosa</i> 219	GIM-1	B
<i>A. baumannii</i> 218	SIM-1	B
<i>A. baumannii</i> 216	OXA-23	D
<i>A. baumannii</i> 245	OXA-25	D
<i>A. baumannii</i> 246	OXA-26	D
<i>A. baumannii</i> 247	OXA-27	D
<i>A. baumannii</i> 172	OXA-51	D
<i>A. baumannii</i> 384	OXA-58	D

<sup>a</sup> Número da amostra referente ao banco de microrganismos do Laboratório Alerta.

**Tabela 4.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes codificadores de  $\beta$ -lactamases.

Tipo de reação de PCR	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Amplicom (pb)	Condições de termociclagem	Referência
PCR Multiplex Metalo β-lactamases	IMP-F1	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	188	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 20 seg; Anelamento: 53°C – 45 seg; Extensão: 72°C – 30 seg; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Mendes <i>et al.</i> , 2007
	IMP-R1	CCAAACYACTASGTTATC				
	VIM-F2	GTTTGGTCGCATACGCAAC	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	382		
	VIM-R2	AATGCGCAGCACCAGGATAG				
	SPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	798		
	SPM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC				
	SIM-F1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	569		
	SIM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG				
	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	72		
	GIM-R1	CGGAACGACCATTTGAATGG				
PCR Multiplex Oxacilinas	OXA 23-F	GATCGCATTGGAGAACCAGA	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	501	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 25 seg; Anelamento: 52°C – 40 seg; Extensão: 72°C – 50 seg; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 6 min.	Woodford <i>et al.</i> , 2006
	OXA 23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT				
	OXA 24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	246		
	OXA 24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT				
	OXA 51-F	TAAAGCTTTGATCGCCCTTG	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	353		
	OXA 51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG				
	OXA 58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	599		
	OXA 58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC				

PCR Multiplex pAmpC	MPCMY-1F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	<i>bla</i> <sub>MOX1-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY1</sub> ,	520	Denaturação: 94°C – 3 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 64°C – 30 seg; Extensão: 72°C – 1 min; 25 ciclos Extensão final: 72°C – 7 min.	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	MPCMY-1R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	<i>bla</i> <sub>CMY8-11</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY19</sub>			
	MPCMY-2F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	<i>bla</i> <sub>CMY2-7</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY12-16</sub> ,	462		
	MPCMY-2R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	<i>bla</i> <sub>CMY18</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY21-24</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY26-33</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY36-37</sub> , <i>bla</i> <sub>LAT1-4</sub>			
	MPDHA-1F	AACCTTTCACAGGTGTGCTGGGT	<i>bla</i> <sub>DHA-1-3</sub>	405		
	MPDHA-1R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC				
	MPACC-F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	<i>bla</i> <sub>ACC1-2</sub>	346		
	MPACC-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC				
	MPMAC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	<i>bla</i> <sub>MIR1-4</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT1-3</sub>	302		
	MPMAC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT				
MPFOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	<i>bla</i> <sub>FOX1-7</sub>	190			
MPFOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG					

PCR Convencional Oxacilinas	OXA 2-F	ATGGCAATCCGAATCTTCGC	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	828	Denaturação: 94°C – 10 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 53°C – 1 min; Extensão: 72°C – 1 min; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Poirel <i>et al.</i> , 2002a; Vahaboglu <i>et al.</i> , 1998; Poirel <i>et al.</i> , 2004;
	OXA 2-R	TTATCGCGCTGCGTCCGAGT				
	OXA 10-F	GTCTTTGAGTACGGCATT	<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	720		
	OXA 10-R	ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC				
	OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	743		
	OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC				
PCR Convencional Serino β-lactamases	SHV-F1	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1051	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 1 min; Anelamento: 61°C – 1 min; Extensão: 72°C – 2 min; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Nagano <i>et al.</i> , 2004
	SHV-R1	TTTATGGCGTTACCTTTGACC				
	TEM-F	CCGTGTCGCCCTTATTCC	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	824	Denaturação: 94°C – 10 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 53°C – 1 min; Extensão: 72°C – 1 min; 35 ciclos; Extensão final: 72°C – 10 min.	Nagano <i>et al.</i> , 2004; Dutour <i>et al.</i> , 2002; Poirel <i>et al.</i> , 2000; Lomaestro <i>et al.</i> ,2006; Queenan <i>et al.</i> , 2000
	TEM-R	AGGCACCTATCTCAGCGA				
	CTX-M-F	CGCTTTGCGATGTGCAG	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	550		
	CTX-M-R	ACCGCGATATCGTTGGT				
	GES-F	ATGCGCTTCATTACGCAC	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	860		
	GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG				
	KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	762		
	KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC				
	SME-F	AACGGCTTCATTTTTGTTTAG	<i>bla</i> <sub>SME</sub>	830		
	SME-R	GCTTCCGCAATAGTTTTATCA				



PCR Convencional	CATB3-FF	ACAATGCCTCTGCTGTGCTC	-	-	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 15 seg; Anelamento: 55°C – 1 min; Extensão: 72°C – 2 min; 40 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Este estudo
	DFR-R	GGAAGAAGGCGTCACCCTC				
	BamGES-F	<u>GGATCC</u> ATGCGCTTCATTACGCA CTATTA	<i>bla<sub>ges</sub></i>	876	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 60°C – 30 seg; Extensão: 72°C – 1,5 min; 40 ciclos Extensão final: 72°C – 15 min.	Este estudo
	NotGES-R	<u>GCGGCC</u> GCTTTGTCCGTGCTCAGG ATGAGTTGTGTAATAA				
PCR Convencional	INT I 1F	CCGTAGAAGAACAGC	<i>intI1</i>		Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 1 min; Anelamento: 60°C – 1 min; Extensão: 72°C – 5 min; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Este estudo
	QAC R	CGGATGTTGCGATTACTTCG	<i>qacEΔ1</i>	-		
	attI1	GCCTGTTCGGTTCGTAAGCT	-			
	sul1FR	GAAGGAGTCCTCGGTGAG	<i>sul</i>			

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pb: pares de bases

pAmpC: AmpC plasmidial

#### 4.5 Estudo da Localização do Gene *bla*<sub>GES</sub> por Hibridização

As amostras foram submetidas à extração do DNA total com o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, França), de acordo com as especificações do fabricante.

A extração do DNA plasmidial das amostras foi realizada pela técnica de Kieser (Kieser, 1984). As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton para isolamento de colônias. Com o auxílio da alça de semeadura, o crescimento bacteriano foi coletado, adicionado a um tubo de microcentrifuga contendo 500 µL da solução de Kieser (Sacarose 0,3 M, Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA Na<sub>2</sub> 25 mM pH 8,0, Verde de Bromocresol 0,02%) e homogeneizado. Foi adicionado 250 µL de solução de lise (SDS 2%, NaOH 0,3N), e os tubos foram invertidos 6 a 8 vezes para homogeneização e incubados em banho-maria à 55°C por 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos e, então, foi adicionado 250 µL da fase inferior de UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A seguir, os tubos foram invertidos 6 a 8 vezes para homogeneização e centrifugados à 12.000 rpm por 12 minutos à 4°C. Trezentos microlitros foi recuperado do sobrenadante, transferido para novos tubos e estocados a -20°C. Plasmídeos extraídos da cepa *E. coli* NCTC 50192 pela mesma metodologia foram utilizados como marcadores de peso molecular plasmidial.

Alíquotas de DNA total e DNA plasmidial das amostras avaliadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% por 3h à 70 V. Posteriormente, o material genético foi transferido para uma membrana de

---

nylon (Hybond-N+, Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) pela técnica de Southern blot. Essa membrana foi submetida a uma reação de hibridização com o Kit ECL *Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems* (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia), segundo as especificações do fabricante. O fragmento de DNA utilizado como sonda foi obtido por amplificação do determinante de resistência em estudo. Para amplificação foi utilizado o par de iniciadores para o gene *bla*<sub>GES</sub> listados na Tabela 4. A sonda foi preparada com o kit ECL *Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems*, segundo as instruções do fabricante.

#### 4.6 Análise da Transferência do Gene *bla*<sub>GES</sub>

A capacidade de transferência do gene *bla*<sub>GES</sub> para cepas de *E. coli* de linhagens laboratoriais foi avaliada pelas metodologias de transformação e conjugação. Paralelamente, a metodologia de transformação foi utilizada para confirmar a localização plasmidial do gene *bla*<sub>GES</sub>.

Os ensaios de transformação foram realizados por eletroporação, utilizando a cepa receptora *E. coli* TOP10. O DNA plasmidial dos isolados SM190 e SM191 foi extraído pela técnica de Kieser descrita previamente (Kieser, 1984). Foi misturado à células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) três microlitros da extração de DNA plasmidial. A mistura foi homogeneizada e transferida para uma cubeta de eletroporação, que foi submetida a um pulso elétrico. Então, 1 mL do meio de cultura SOC (Invitrogen Carlsbad, EUA) foi adicionado à cubeta, que foi incubada à 37° C por 1 hora. Em seguida, 200 µL do caldo foi inoculado em cinco placas que

---

continham 50 µg/mL de ticarcilina, que foram então incubadas por 18 a 24 horas à 37° C. A confirmação da transferência do gene *bla*<sub>GES</sub> foi realizada pela técnica de PCR a partir das colônias de transformantes obtidos, utilizando os oligonucleotídeos GES-F e GES-R (Tabela 4).

Para os ensaios de conjugação, foi utilizada a cepa receptora *E. coli* J53, resistente à azida, e os transformantes EC190 e EC191 como cepas doadoras. Uma a três colônias das bactérias doadora e receptora foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB e incubadas por três horas à 37° sob agitação lenta. Após este período foram misturados 200 µL e 800 µL das suspensões de células doadoras e receptoras, respectivamente, e a mistura foi incubada a 37° C e sob agitação lenta por mais três horas. Após este período, 600 µL desta mistura foi inoculado em três placas seletivas contendo azida 150 µg/mL e ticarcilina 200 µg/mL, que foram então incubadas à 37° C, por 18 a 24 horas. Ainda, foi adicionado 1 mL de caldo TSB aos 400 µL restantes da mistura, que foi incubada novamente à 37° C, por 18h a 24h, sem agitação. No dia seguinte, 600 µL desta mistura foi semeado em três placas seletivas contendo azida 150 µg/mL e ticarcilina 200 µg/mL, que foram incubadas à 37° C, por 18 a 24 horas. A confirmação da transferência do gene *bla*<sub>GES</sub> seria realizada pela técnica de PCR a partir das colônias de transconjugantes obtidas, utilizando os oligonucleotídeos GES-F e GES-R (Tabela 4).

#### 4.7 Clonagem do Gene *bla*<sub>GES-16</sub>

A clonagem do gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi realizada utilizando o vetor TOPO TA<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA), que possui como marcador de seleção o gene que

---

confere resistência à canamicina. Para a clonagem, o gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores CATB3-FF e DFR-R, o DNA plasmidial extraído do transformante EC190 como DNA alvo e a enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos CATB3-FF e DFR-R anelam-se aos genes localizados adjacente ao *bla*<sub>GES-16</sub>, para amplificação de toda a sequência codificante de GES-16. Suas sequências e as condições de termociclagem estão descritas na Tabela 4. O produto de PCR obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e submetido à reação de adição de cauda poli-A, segundo as recomendações do fabricante da DNA polimerase (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A seguir, o amplicon foi clonado no vetor TOPO TA<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA) utilizando o TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), segundo as recomendações do fabricante, e inserido em *E. coli* TOP10 eletrocompetente por transformação por meio da técnica de eletroporação. As colônias recombinantes foram selecionadas em placas contendo meio Luria-Bertani (LB) ágar com 50 µg/mL de canamicina. A presença do inserto no vetor foi confirmada através da amplificação por PCR e, posterior, sequenciamento, utilizando os oligonucleotídeos M13-F e M13-R do TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), que anelam-se à sequências adjacentes ao sítio de clonagem do vetor. Uma vez confirmada a obtenção do gene *bla*<sub>GES-16</sub> clonado, a colônia de *E. coli* TOP10 contendo o inserto correspondente, denominada EC-REC, foi armazenada em freezer -80 °C, em caldo LB contendo 15% de glicerol, até sua utilização em outros experimentos.

---

#### **4.8 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os Transformantes EC190 e EC191, e para a Cepa EC-REC Carreando *bla*<sub>GES-16</sub> Clonado**

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos transformantes obtidos EC190 e EC191, contendo o plasmídeo carreador de *bla*<sub>GES-16</sub>, da cepa EC-REC, contendo o gene *bla*<sub>GES-16</sub> clonado, e da cepa receptora *E. coli* TOP10, por meio da técnica de microdiluição em caldo, descrita previamente, seguindo as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI, 2009). As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com os critérios do CLSI (CLSI, 2010).

Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), amicacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil); aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA); cefepima (Bristol-Myers Squibb); ceftazidima (Strides Arcolab, Bangalore, Índia); ciprofloxacina (Fresenius Robi, Alemanha); ertapenem (Merck Sharp, Clermont-Ferrand, França), gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); imipenem (Merck Sharp, Nova Jersey, EUA); meropenem (Astra Zeneca, Londres, Inglaterra) e ticarcilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os antimicrobianos imipenem, meropenem, ertapenem e ticarcilina foram também testados em associação com ácido clavulânico (2 µg/mL com ticarcilina, e 4 µg/mL com carbapenens, segundo as recomendações do CLSI (2009). (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para o controle de qualidade do teste de sensibilidade, as amostras da “American

---

Type Culture Collection" (ATCC®) *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 foram utilizadas.

#### 4.9 Determinação do Ponto Isoelétrico (pI) da $\beta$ -lactamase GES-16

Para focalização do pI foram utilizados extratos protéicos dos isolados SM190 e SM191, de seus respectivos transformantes EC190 e EC191, e da cepa *E. coli* TOP10 contendo o gene *bla*<sub>GES-16</sub> clonado EC-REC. As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar sangue para isolamento de colônias. Com o auxílio da alça de semeadura, 10 a 15 colônias foram suspensas em 10 mL de TSB e incubadas por 18 horas à 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 3.000 rpm e o centrifugado (células) foi ressuspenso em 1 mL de tampão (Tris HCl 1mM e ZnSO<sub>4</sub> 1mM). Este inóculo foi então ultra-sonicado por 30 segundos, com amplitude de até 40%, quatro vezes (Sonics Vibra Cell™; Newtown, EUA), e a seguir centrifugado por 15 minutos à 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras mantidas no gelo até o momento do ensaio.

Em uma placa de microdiluição, 20  $\mu$ L do indicador de  $\beta$ -lactamase (Nitrocefina 0,5 mg/mL, pH 7.0) foi pipetado em várias células. Então, 1  $\mu$ L, 3  $\mu$ L, 5  $\mu$ L e 7  $\mu$ L do extrato protéico foram pipetados gradativamente nas células que continham nitrocefina, para determinação da quantidade a ser dispensada no gel de pI.

A corrida eletroforética foi realizada em géis de poli(acrilamida) com intervalo de pH entre 3,5 - 9,5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ,

---

EUA) utilizando o sistema *Multiphor II Electrophoresis System* (Pharmacia Biotech), seguindo os parâmetros de corrida eletroforética adequados ao intervalo de pH presente no gel. O gel foi revelado com 500 mM de nitrocefina (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD). O extrato de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases com pontos isoelétricos conhecidos foram utilizados como controles (TEM-1, pI = 5,4; FOX-5, pI = 7,2; SHV-5, pI = 7,8), e o posicionamento das bandas foi utilizado para cálculo do pI das  $\beta$ -lactamases presentes nas amostras testadas utilizando o teste de regressão linear do pacote de análises estatísticas do programa Excel (Microsoft™, Washington, EUA).

#### 4.10 Clonagem de *bla*<sub>GES-16</sub> em Vetor de Expressão

Para clonagem em vetor de expressão, o gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BamGES-F e NotGES-R, o DNA plasmidial extraído dos transformantes EC190 e EC191 como DNA alvo, e a enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos BamGES-F e NotGES-R foram desenhados especificamente para adicionar os sítios de restrição das enzimas BamHI na extremidade 5' do gene, e NotI na extremidade 3' do gene, para a posterior clonagem na correta fase de leitura do vetor de expressão, com a adição de cauda de Histidina em ambos N- e C-terminal da GES-16. A sequência dos oligonucleotídeos BamGES-F e NotGES-R e as condições de termociclagem estão descritas na Tabela 4, e os sítios de restrição adicionados

---



estão sublinhados nas respectivas sequências. O produto de PCR obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e submetido à reação de adição de cauda poli-A, segundo as recomendações do fabricante da DNA polimerase (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A seguir, o amplicon foi clonado no vetor T/A pTZ57-R/T (InsTAclone™ PCR Cloning Kit; Fermentas, Burlington, Canadá) e inserido em *E. coli* DH5α quimiocompetente por transformação através da técnica de choque térmico. As colônias recombinantes foram selecionadas em placas contendo meio Luria-Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de ampicilina, e a presença do inserto no vetor foi confirmada através da amplificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos BamGES-F e NotGES-R. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Courtaboeuf, France), e duplamente digerido em volume final de 50 µL com 0,25 µL da enzima de restrição BamHI (10U/µL) (Fermentas, Burlington, Canadá) e 0,25 µL da enzima NotI (10U/µL) (Fermentas, Burlington, Canadá) à 37°C por 18 horas, bem como o vetor de expressão pET28 (Novagen, Madison, USA). Os produtos digeridos foram analisados em gel de agarose 1% para identificação de colônias que continham o inserto *bla*<sub>GES-16</sub> e para a verificação da linearização do vetor. Os produtos da digestão foram então purificados (Kit QIAquick PCR Purification; Qiagen, Courtaboeuf, France) e o inserto foi clonado no vetor pET28 para construção da GES-16 recombinante com cauda de Histidina em suas regiões N- e C-terminal. O vetor de expressão construído, nomeado pET-GES16, foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, USA) quimiocompetente por transformação através de choque térmico. As colônias recombinantes foram

---

selecionadas em placas contendo meio LB ágar com 50 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol. A presença do inserto no vetor de expressão foi confirmada por amplificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos BamGES-F e NotGES-R, e o correto posicionamento do inserto codificador da GES-16 na fase correta de leitura do vetor foi confirmado por sequenciamento. Uma vez confirmada a obtenção do inserto clonado em vetor de expressão, por análise manual das seqüências obtidas, a colônia contendo o inserto correspondente foi armazenada em freezer -80 °C, em caldo LB contendo 15% de glicerol, até o momento de amplificação para expressão da proteína correspondente.

#### **4.11 Expressão e Purificação da GES-16**

As colônias de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas com o vetor pET-GES16 foram subcultivadas em ágar LB contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL). Após o crescimento bacteriano, uma única colônia isolada foi transferida com auxílio de uma alça de semeadura para um tubo cônico de 50 mL contendo 5 mL de caldo LB, canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL), e incubada à 37°C sob agitação constante por 16h. Após incubação, esta cultura foi transferida para um frasco contendo um litro de caldo LB, canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL), e incubada à 30°C com agitação até atingir um valor de absorbância entre 0,5 e 0,6 a 600 nm. Nesse momento a temperatura de incubação foi reduzida para 20°C, e foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) a uma concentração final de 0.5 mM como indutor da expressão da proteína recombinante. Após incubação por 14-16 h, o processo foi interrompido e a cultura foi submetida à

---

centrifugação (5000 x g durante 20 minutos) para sedimentação das bactérias e descarte do sobrenadante. As células bacterianas foram ressuspensas em 20 mL de tampão de ligação (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0), incubadas durante 20 minutos na presença de lisozima (10 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), à temperatura ambiente, e então submetidas à sonicação (4 ciclos de ultra-som de 1minuto à 60hz, em banho de gelo, com intervalo de 1 minuto entre cada ciclo). O lisado obtido foi centrifugado por 20 minutos a 15.000 rpm à 4°C para remoção dos debris celulares. O sobrenadante foi utilizado nas etapas subseqüentes de purificação cromatográfica. A primeira etapa de purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade utilizando a coluna de cromatografia de alta performance Ni-Sepharose (GE Healthcare, Orsay, France) previamente equilibrada com tampão de ligação. GES-16 recombinante foi eluída da coluna utilizando diferentes concentrações de imidazol (50, 100 e 150 mM) em tampão de ligação. As frações coletadas que apresentaram atividade β-lactamase (testadas com Nitrocefina) foram aplicadas a uma coluna 'desalting prep' com tampão de ligação, para dessalinização. As frações de material não-retido que apresentaram altos níveis de atividade β-lactamase foram coletadas e agrupadas. Alíquotas destas frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e as frações contendo GES-16 recombinante com alto grau de pureza foram recuperadas, quantificadas pela técnica de Bradford, aliquotadas e armazenadas em 100 mM de tampão fosfato a -70°C.

#### 4.12 Cinética

---

#### 4.12.1 Determinação das Constantes de Michaelis-Menten

A hidrólise dos substratos foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro U 2000 UV (Hitachi, Tóquio, Japão). O ensaio foi realizado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, em compartimento termostatizado a 30°C, e foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 1 cm com volume final de 1 mL. Diferentes concentrações de cada substrato foram adicionadas à cubeta. Após a adição da solução de enzima purificada, a absorbância foi monitorada em função do tempo por 3 a 5 minutos e o coeficiente angular (*slope*) foi convertido em nmol de substrato hidrolisado por minuto baseado nos coeficientes de extinção molar dos substratos, previamente conhecidos. Foram utilizados os seguintes coeficientes de extinção molar ( $\Delta\epsilon$ ), bem como os comprimentos de onda de leitura ( $\lambda$ ): para benzilpenicilina ( $\lambda = 232$  nm),  $-1,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para oxacilina ( $\lambda = 260$  nm),  $+470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para cefalotina ( $\lambda = 262$  nm),  $-7,960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para cefoxitina ( $\lambda = 265$  nm),  $-7,380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para cefotaxima ( $\lambda = 265$  nm),  $-6,260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para ceftazidima ( $\lambda = 260$  nm),  $-8,660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para cefepima ( $\lambda = 264$  nm),  $-8,240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para aztreonam ( $\lambda = 318$  nm),  $-640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para imipenem ( $\lambda = 297$  nm),  $-9,210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para meropenem ( $\lambda = 297$  nm),  $-6,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; e para ertapenem (298 nm),  $-7,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Celenza *et al.*, 2008; Giuliani *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2000)

As constantes cinéticas foram determinadas a partir das velocidades iniciais de hidrólise (< 10% da hidrólise total) em diferentes concentrações dos substratos, utilizando a equação descrita por Michaelis-Menten com o auxílio do programa GRAFIT versão 5.0 (Erithacus Software, Steines, UK) e considerando a concentração de enzima empregada nos ensaios. Os valores de  $k_{cat}$  e  $K_m$  foram estimados utilizando regressão não-linear por mínimos

quadrados. Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com Wilkinson, bem como pelo uso de plotagens Eadie-Hofstee (Wilkinson *et al.*, 1961).

#### 4.12.2 Determinação das Constantes de Inibição

A inibição da hidrólise dos substratos (determinação das constantes  $K_i$  e /ou  $k_{inac}$ ) pelo ácido clavulânico, tazobactam e imipenem foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro U 2000 UV (Hitachi, Tóquio, Japão), e benzilpenicilina como substrato-repórter. O ensaio foi realizado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, em compartimento termostatizado à 30°C, e foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 1 cm com volume final de 1 mL. Diferentes concentrações de cada inibidor foram previamente incubadas com a enzima purificada. Após a adição da solução de enzima com inibidor à cubeta contendo o substrato (300 mM de benzilpenicilina), a absorbância foi monitorada em função do tempo por 3 a 5 minutos e o coeficiente angular (*slope*) foi convertido em nmol de substrato hidrolisado por minuto, baseado no coeficiente de extinção molar da benzilpenicilina) e considerando a concentração de enzima empregada nos ensaios. As diferenças entre os *slopes* foram avaliadas para obtenção da constante de inibição ( $K_i$ ) com o auxílio do programa GRAFIT versão 5.0 (Erithacus Software, Steines, UK).

A determinação dos parâmetros de inibição foi realizada como segue: para o imipenem, que se comporta como um inibidor competitivo, a equação utilizada para cálculo do valor de  $K_i$  foi  $K_i = K_{i\ ap}/(1+[S]/K_m)$ , onde  $[S]$  = concentração molar do substrato,  $K_m$  = constante de Michaelis-Menten, e  $K_{i\ ap}$  =

---

constante de inibição aparente ( $K_{i\ ap} = IC_{50}$ ).  $K_{i\ ap}$  foi calculado utilizando a equação  $V_0/V_i = 1 + [I]/K_{i\ ap}$ , onde  $V_0$  = velocidade de hidrólise do substrato na ausência do inibidor,  $V_i$  = velocidade de hidrólise do substrato na presença do inibidor, e  $[I]$  = concentração molar do inibidor. A plotagem de  $(V_0/V_i) - 1$  por  $[I]$  fornece o *slope* de  $1/K_{i\ ap}$ . Por outro lado, o ácido clavulânico e o tazobactam comportam-se como inibidores irreversíveis tempo-dependentes, e portanto  $k_{inat}$  foi determinado utilizando os valores obtidos de  $k_{obs}/[I]$ , onde  $k_{obs}$  é a taxa de inativação de pseudo-primeira ordem observada (obtida através da plotagem do logaritmo da porcentagem de atividade pelo tempo) e  $[I]$  é a concentração molar do inibidor. O parâmetro  $k_{obs}/[I]$  é válido desde que a ligação do inibidor à enzima não se sature (caso em que  $k_{obs} = k_{inat}$ ) (Cunha *et al.*, 2009).

---

## 5. *RESULTADOS*

---

### 5.1 Amostras Bacterianas

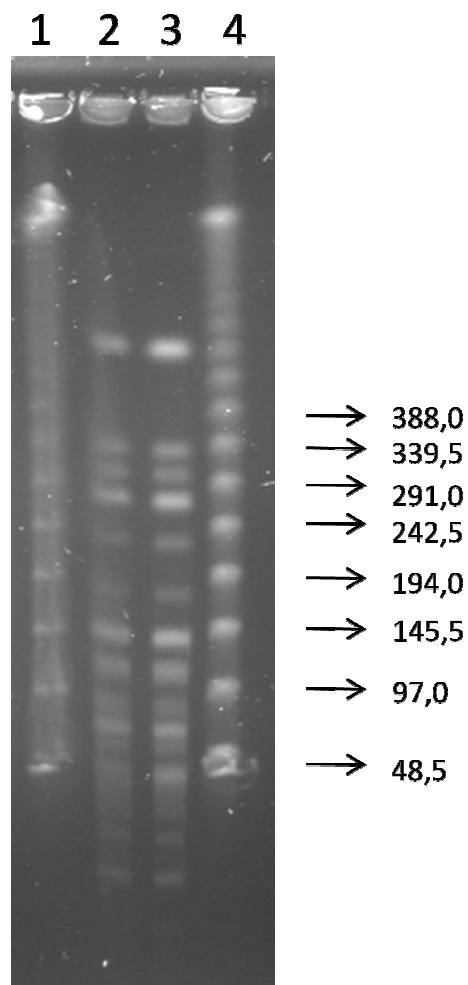
As duas amostras clínicas de *S. marcescens* enviadas ao Laboratório ALERTA, isoladas da corrente sanguínea e da secreção brônquica de dois pacientes internados na UTI do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), Rio de Janeiro, em 2005, foram denominadas SM190 e SM191, respectivamente. Os isolados haviam sido previamente avaliados pelo Laboratório de Microbiologia do HUPE, e testes de sensibilidade por disco-difusão revelaram que ambos apresentavam resistência aos carbapenems (imipenem e meropenem). O fenótipo observado era incomum para o período em que as bactérias foram isoladas, e despertou o interesse para o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenems.

### 5.2 Tipagem Molecular por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A análise da similaridade genética pela técnica de PFGE demonstrou que os dois isolados clínicos de *S. marcescens* pertenciam a um mesmo clone, pois apresentaram perfil eletroforético idêntico (Figura 8), segundo a interpretação de Tenover e colaboradores (Tenover *et al.*, 1995).

---





**Figura 8.** Avaliação da similaridade genética entre os isolados clínicos SM190 e SM191 pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, cujos DNAs genômicos foram digeridos com *SpeI* e separados por eletroforese em campo pulsátil com variação de corrente elétrica de 5 a 60 segundos, por 23h a 200V. Coluna 1, padrão de peso molecular  $\lambda$  (Kb); Coluna 2, *S. marcescens* SM190; Coluna 3, *S. marcescens* SM191; Coluna 4, padrão de peso molecular  $\lambda$  (Kb).

### 5.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das amostras SM190 e SM191 frente aos antimicrobianos testados estão apresentadas na Tabela 5.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos confirmou a resistência aos carbapenems dos dois isolados clínicos de *S. marcescens* SM190 e SM191.

Adicionalmente, ambos os isolados apresentaram resistência à ticarcilina, à ceftazidima, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico, mas apresentaram sensibilidade à cefepima e ao aztreonam. O isolado SM190 apresentou sensibilidade intermediária à ampicilina, enquanto o isolado SM191 apresentou-se sensível a este antimicrobiano, devido à diferença de uma diluição nas CIMs determinadas.

A associação do ácido clavulânico aos antimicrobianos testados (ticarcilina e carbapenens) não foi capaz de causar diminuição nas CIMs, quando comparadas às CIMs para os mesmos antibióticos na ausência de clavulanato, para os isolados SM190 e SM191.

#### **5.4 Detecção dos Mecanismos de Resistência aos Carbapenens**

##### **5.4.1 Teste de Hidrólise Enzimática do Imipenem**

A hidrólise do imipenem foi observada para os extratos protéicos de ambos isolados SM190 e SM191.

##### **5.4.2 Detecção de Genes Codificadores de $\beta$ -lactamases**

Não houve detecção de nenhum gene codificador das metalo- $\beta$ -lactamases *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> e *bla*<sub>SIM</sub>, da oxacilinase *bla*<sub>OXA-2</sub>, das oxacilinasas do tipo carbapenemase *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub>, das serino- $\beta$ -lactamases *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>SME</sub>, e das pAmpC *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> e *bla*<sub>DHA</sub> nos

---

isolados SM190 e SM191. Em contrapartida, os genes *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>OXA-10</sub> foram detectados em ambos isolados.

**Tabela 5.** Teste de sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados clínicos de *S. marcescens* SM190 e SM191, seus transformantes EC190 e EC191, a cepa EC-REC contendo o gene *bla*<sub>GES-16</sub> clonado e a cepa receptora *E. coli* TOP10, realizado pela técnica de microdiluição em caldo, segundo as recomendações do CLSI (2010).

	SM190	SM191	EC190	EC191	EC-REC	<i>E. coli</i> TOP10
Antimicrobiano	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
Ticarcilina	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	2
Ticarcilina + AC <sup>a</sup>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	2
Ceftazidima	16	16	8	8	8	0,25
Cefepima	2	4	0,25	0,25	0,5	≤ 0,06
Imipenem	32	32	0,5	0,5	0,5	0,12
Imipenem + AC <sup>a</sup>	32	32	0,25	0,25	0,06	0,06
Meropenem	64	64	0,25	0,25	0,25	0,015
Meropenem + AC <sup>a</sup>	64	64	0,06	0,06	0,06	0,015
Ertapenem	64	64	0,25	0,25	0,25	0,006
Ertapenem + AC <sup>a</sup>	64	64	0,006	0,006	0,006	0,003
Aztreonam	4	2	0,25	0,25	0,25	0,12
Ác. Nalidíxico	> 128	> 128	2	2	2	1
Ciprofloxacina	4	4	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06
Gentamicina	> 64	64	2	1	2	1
Amicacina	32	16	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2

<sup>a</sup>AC: Ácido clavulânico.

CIM: Concentração Inibitória Mínima

### 5.4.3 Sequenciamento e Interpretação dos Resultados

O sequenciamento dos amplicons obtidos por amplificação do gene codificador das oxacilinases do grupo OXA-10 confirmou a presença do gene *bla*<sub>OXA-10</sub> em ambos isolados, SM190 e SM191.

O sequenciamento dos amplicons obtidos por amplificação de *bla*<sub>GES</sub> revelou a identificação de uma nova variante de GES, nomeada GES-16, nos dois isolados clínicos de *S. marcescens*. O gene codificador de GES-16 possui 4 mutações em relação à sequência descrita de GES-1: C por G na base 112, G por A na base 493, T por C na base 591 e A por G na base 645. A sequência de aminoácidos de GES-16, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtida, possui apenas 2 substituições de aminoácidos quando comparada à sequência de GES-1, embora tenham sido detectadas 4 mutações na sequência nucleotídica. GES-16 possui um ácido glutâmico ao invés de uma glutamina na posição 43 de Ambler (Q43E), e possui uma serina ao invés de glicina na posição 170 de Ambler (G170S), localizada no interior da região  $\Omega$ -loop das  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler (Poirel *et al.*, 2000).

A análise do sequenciamento dos amplicons obtidos demonstrou que *bla*<sub>GES-16</sub> está inserido em um integron de classe 1 que possui o gene codificador da integrase *IntI1* truncado. Este gene perdeu 8 aminoácidos na sua porção N-terminal, incluindo o promotor P<sub>2</sub>, o promotor que dirige a expressão da integrase P<sub>int</sub> e seu sítio de recombinação *attI1*. O promotor P<sub>c</sub> foi identificado no gene da integrase, tratando-se de uma variante fraca (Collins & Hall, 1995; Le'vesque *et al.*, 1994; Papagiannitsis *et al.*, 2009). O gene *bla*<sub>GES-16</sub> estava localizado na segunda posição do integron, imediatamente à

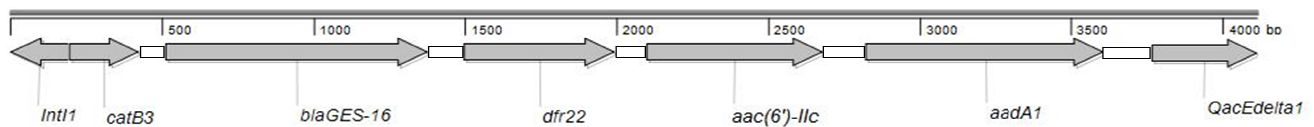
---

jusante do gene *catB3* truncado, que perdeu 134 aminoácidos na sua porção N-terminal. O cassete gênico *bla*<sub>GES-16</sub> possuía um sítio de recombinação *attC* composto por 110 pares de bases (pb), que apresentava uma sequência de Shine-Delgarno (SD) (AGGCG) localizada 48 pb à montante do códon de iniciação de *bla*<sub>GES-16</sub>. Os seguintes cassetes gênicos estavam presentes à jusante de *bla*<sub>GES-16</sub>: *dfr22*, *aac(6')-IIC* e *aadA1*, codificadores das enzimas dihidrofolato redutase, aminoglicosídeo 6'-N-acetiltransferase e aminoglicosídeo adeniltransferase, respectivamente. A sequência do integron carreador do gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi depositada no GenBank com número de acesso HM173356. A representação esquemática do integron está apresentada na Figura 9 (A). A Figura do Anexo I apresenta a sequência completa do integron identificado neste estudo, onde estão indicados os cassetes gênicos, as estruturas 1L, 2L, 1R e 2R de seus respectivos *attCs*, e o promotor P<sub>c</sub> com suas sequências consenso -35 e -10.

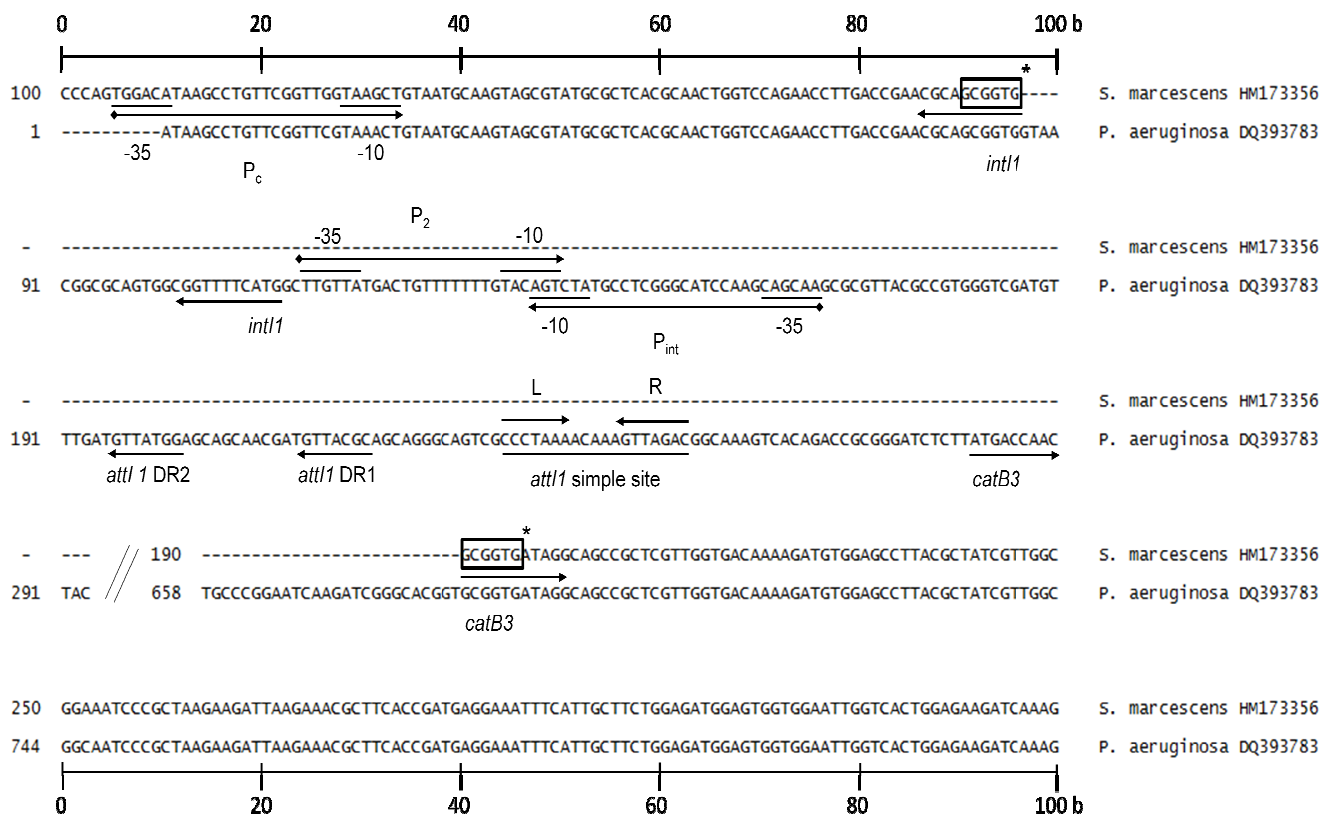
A comparação da sequência de nucleotídeos do integron identificado neste estudo (Número de acesso no GenBank HM173356) com um integron similar previamente identificado em *Pseudomonas aeruginosa* (Número de acesso no GenBank DQ393783) permite a análise e visualização das estruturas perdidas no integron carreador do gene *bla*<sub>GES-16</sub>, bem como a provável região onde aconteceu a recombinação homóloga (Figura 9 (B)).

---

A.



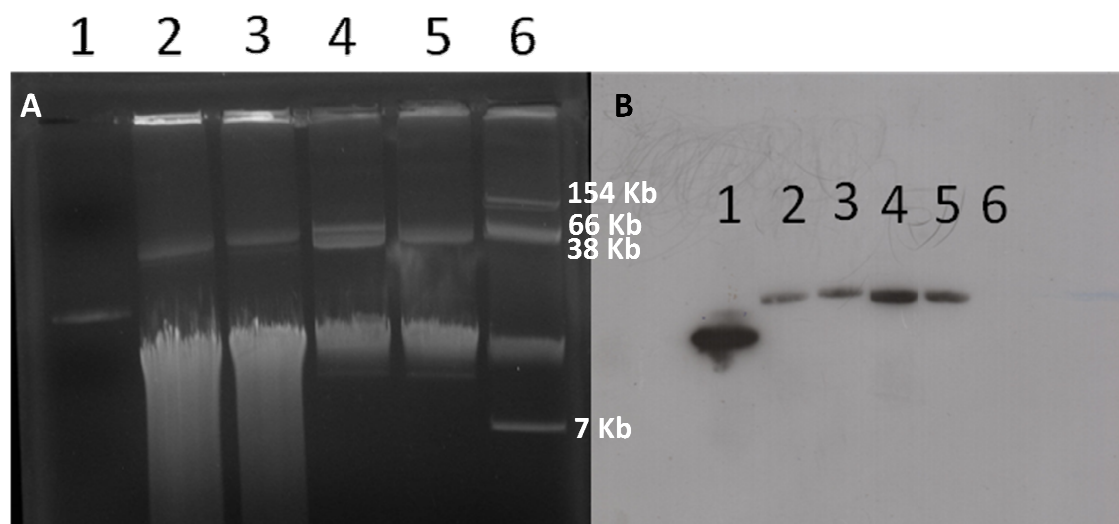
B.



**Figura 9.** (A) Representação esquemática do integron carreador do gene *bla*<sub>GES-16</sub>. As setas cinzas representam as regiões codificantes e indicam o sentido da transcrição, e os *att*Cs estão indicados por retângulos brancos. (B) Comparação entre a sequência de nucleotídeos do integron identificado neste estudo (número de acesso no GenBank HM173356) e um integron similar previamente identificado em *Pseudomonas aeruginosa* (número de acesso no GenBank DQ393783), demonstrando as estruturas perdidas no primeiro. As sequências -35 e -10 dos promotores P<sub>c</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>int</sub> estão identificadas. Os códons de iniciação dos genes *int11* e *catB3* estão indicados por setas horizontais nas duas sequências nucleotídicas, enquanto o sítio de recombinação *attI1* (domínios DR1, DR2, L e R), faltante no integron carreador de *bla*<sub>GES-16</sub>, está indicado na sequência de *P. aeruginosa*. A provável região onde ocorreu recombinação homóloga está destacada e indicada por asterisco na sequência de *S. marcescens*.

### 5.5 Estudo da Localização do Gene *bla*<sub>GES-16</sub> por Hibridização

Foi observada hibridização da sonda nas extrações de DNA total e DNA plasmidial dos dois isolados SM190 e SM191 (Figura 10), sugerindo a localização plasmidial do gene *bla*<sub>GES-16</sub>.

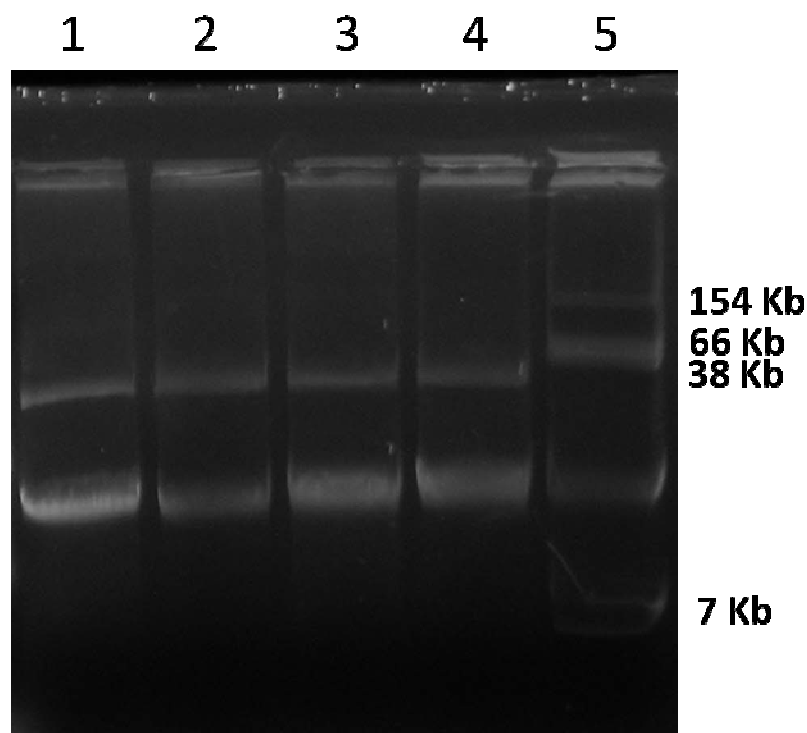


**Figura 10.** (A) Eletroforese das extrações de DNA total e DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191. (B) Hibridização da sonda marcada específica para o gene *bla*<sub>GES-16</sub> com as extrações de DNA total e DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191. Coluna 1, sonda marcada específica para *bla*<sub>GES-16</sub>; Coluna 2, DNA total da amostra SM190; Coluna 3, DNA total da amostra SM191; Coluna 4, DNA plasmidial da amostra SM190; Coluna 5, DNA plasmidial da amostra SM191; Coluna 6, DNA plasmidial da amostra 50192, utilizada como marcador de peso molecular (7 Kb, 38 Kb, 66 Kb, 154 Kb).

### 5.6 Análise da Transferência do Gene *bla*<sub>GES-16</sub>

Foram obtidos transformantes a partir das extrações plasmidiais de ambos isolados clínicos, SM190 e SM191. Os transformantes obtidos foram denominados EC190 e EC191, respectivamente, e carregavam um único plasmídeo visível, que possuía peso molecular aproximado de 30 kb, assim como observado nas extrações plasmidiais dos isolados clínicos (Figura 11). A

presença do gene *bla*<sub>GES-16</sub> nos transformantes foi confirmada por PCR e sequenciamento, confirmando sua localização plasmidial.



**Figura 11.** Eletroforese das extrações de DNA plasmidial dos isolados clínicos SM190 e SM191 e de seus respectivos transformantes. Coluna 1, DNA plasmidial da amostra SM190; Coluna 2, DNA plasmidial do transformante EC190; Coluna 3, DNA plasmidial da amostra SM191; Coluna 4, DNA plasmidial do transformante EC191; Coluna 5, DNA plasmidial da amostra 50192, utilizada como marcador de peso molecular (7 Kb, 38 Kb, 66 Kb, 154 Kb).

Em contrapartida, não foram obtidos transconjugantes por meio dos experimentos realizados utilizando os transformantes EC190 e EC191 como cepas doadoras, e a cepa receptora *E. coli* J53.

### 5.7 Clonagem do Gene *bla*<sub>GES-16</sub>



O gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi clonado com sucesso no vetor TOPO TA<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e introduzido em *E. coli* TOP10. Sua correta inserção no vetor foi confirmada por PCR e sequenciamento, e a cepa foi denominada EC-REC.

### **5.8 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os Transformantes EC190 e EC191, e para a Cepa EC-REC Carreando *bla*<sub>GES-16</sub> Clonado**

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos transformantes obtidos EC190 e EC191, da cepa EC-REC carreando *bla*<sub>GES-16</sub> clonado, e da cepa receptora *E. coli* TOP10 frente aos antimicrobianos testados estão apresentados na Tabela 5, juntamente com os resultados referentes aos isolados clínicos de *S. marcescens* SM190 e SM191.

A transformação do plasmídeo contendo *bla*<sub>GES-16</sub> em *E. coli* TOP10, bem como a clonagem de *bla*<sub>GES-16</sub> no vetor TOPO TA<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA), ocasionaram a elevação das CIMs para os carbapenems. As CIMs de imipenem de EC190, EC191 e EC-REC superaram aquela da cepa *E. coli* TOP10 em 2 diluições, enquanto que para meropenem e ertapenem as CIMs destas cepas foram 4 e 5 diluições maiores, respectivamente, do que as CIMs da célula receptora. Foram observados também aumentos nas CIMs para as cefalosporinas e para a penicilina ticarcilina quando comparadas às amostras EC190, EC191 e EC-REC em relação à *E. coli* TOP10. Entretanto, tais aumentos não foram observados para aztreonam, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina e ampicilina.

---

Entre os transformantes, a presença do ácido clavulânico provocou uma diminuição nas CIMs de meropenem e ertapenem, embora não tenha sido observada diminuição significativa nas CIMs de imipenem e ticarcilina. Em contrapartida, para a cepa EC-REC, a presença do ácido clavulânico provocou diminuição nas CIMs de imipenem, meropenem, e ertapenem, mas não na CIM de ticarcilina.

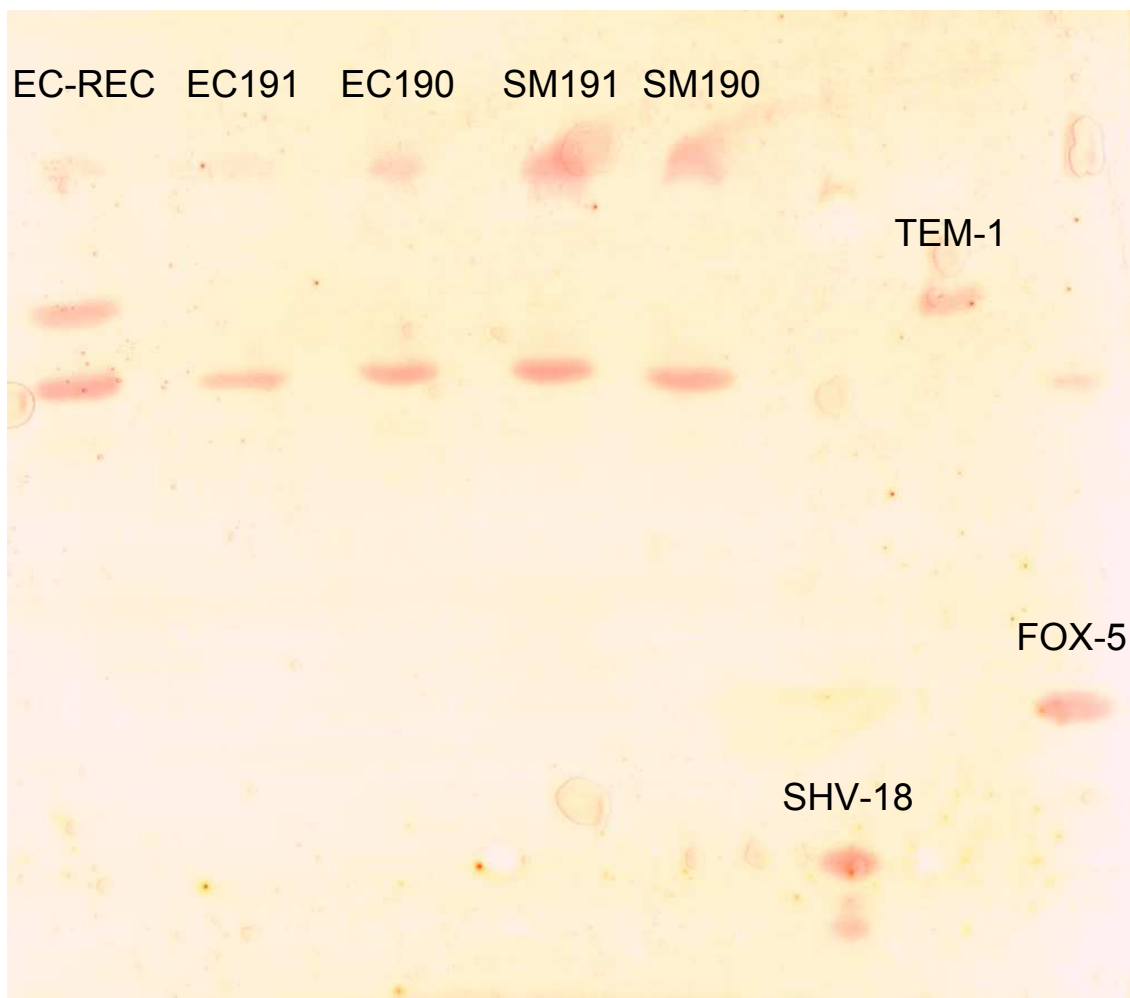
### **5.9 Determinação do pI da $\beta$ -lactamase GES-16**

Foram observadas duas bandas na focalização do pI dos extratos protéicos dos isolados SM190 e SM191 e de seus respectivos transformantes EC190 e EC191, enquanto no extrato de EC-REC foram observadas três bandas (Figura 12). Os valores de pI das bandas detectadas foram calculados a partir da curva de regressão linear obtida com a focalização das  $\beta$ -lactamases presentes nos extratos das amostras-controles, que apresentou coeficiente  $R^2=0,9944$ .

A primeira banda, observada nos extratos de todas as cepas avaliadas, apresentou valor de pI igual a 4,9. A segunda banda, observada apenas no extrato da amostra EC-REC, apresentou pI de 5,4. A terceira banda, bem visível e presente na mesma altura nos extratos de todas as amostras avaliadas, corresponde à GES-16, cujo valor de pI foi igual a 5,6.

Nos extratos protéicos dos isolados SM190 e SM191 não foi observada a presença da banda correspondente à  $\beta$ -lactamase OXA-10 (pI = 6,1).

---



**Figura 12.** Focalização do ponto isoelétrico dos extratos protéicos dos isolados clínicos SM190 e SM191, de seus transformantes EC190 e EC191, da cepa EC-REC contendo *bla*<sub>GES-16</sub> clonado, e das amostras-controles TEM-1 (pI = 5,4), FOX-5 (pI = 7,2) e SHV-18 (pI = 7,8).

#### **5.10 Clonagem de *bla*<sub>GES-16</sub> em Vetor de Expressão, Expressão em *E. coli* e Purificação da GES-16**

GES-16 recombinante foi clonada com sucesso no vetor de expressão, e expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, com a cauda de histidina adicionada às suas regiões N- e C-terminal. A enzima foi purificada e a análise em SDS-PAGE revelou a presença de uma única banda de aproximadamente 31 kDa, com pureza superior a 90%, correspondente à GES-16.

## 5.11 Cinética

### 5.11.1 Determinação das Constantes de Michaelis-Menten

As constantes  $K_m$  e  $k_{cat}$  de GES-16 determinadas para os substratos avaliados encontram-se listadas na Tabela 6.

Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram o amplo espectro hidrolítico de GES-16. A enzima foi capaz de hidrolisar as penicilinas, cefamicina, cefalosporinas e carbapenens. No entanto, não foi capaz de hidrolisar o azteonam.

No geral, GES-16 apresentou afinidade ( $K_m$ ) similar por benzilpenicilina, oxacilina, cefalotina, cefoxitina e cefepima. Entretanto, benzilpenicilina e cefalotina foram os substratos mais eficientemente hidrolisados, devido aos maiores valores de  $k_{cat}$ , que representa o número de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima, sob condições de saturação. Embora GES-16 tenha apresentado maior afinidade pelos carbapenens do que por outros substratos, alguns deles não foram tão eficientemente hidrolisados devido aos baixos valores de  $k_{cat}$ . Ainda, embora os carbapenens tenham apresentado valores tão baixos de  $k_{cat}$ , especialmente meropenem e ertapenem, o que implica em baixos valores de  $k_{cat}/K_m$  ( $k_{cat}/K_m$  = eficiência catalítica), ainda assim ceftazidima e cefepima foram os substratos menos eficientemente hidrolisados por GES-16, provavelmente devido à menor afinidade (maiores valores de  $K_m$ ) da enzima por estes substratos.

Entre as cefalosporinas, a cefalotina e a cefotaxima foram os substratos mais eficientemente hidrolisados por GES-16, pois apresentaram maiores

---

valores de  $k_{cat}/K_m$ . Apesar de serem ambas cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima não foi tão eficientemente hidrolisada quanto cefotaxima devido principalmente ao baixo valor de  $k_{cat}$ , além da menor afinidade à enzima. A eficiência catalítica de GES-16 para cefepima foi ainda menor do que para ceftazidima, devido ao baixo valor de  $k_{cat}$  e elevado  $K_m$  encontrados, indicando que cefepima não é um bom substrato para esta enzima.

Imipenem foi o carbapenem mais eficientemente hidrolisado por GES-16. Embora imipenem e meropenem tenham apresentado afinidades similares à GES-16, meropenem foi menos hidrolisado do que o imipenem devido ao valor inferior de  $k_{cat}$  encontrado. Ertapenem foi o pior substrato carbapenêmico, especialmente devido ao valor muito baixo de  $k_{cat}$  encontrado.

**Tabela 6.** Perfil hidrolítico da  $\beta$ -lactamase GES-16<sup>a</sup>.

Substrato	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )
Benzilpenicilina	35,48	88,43	401,24
Oxacilina	3,24	72,92	44,37
Cefalotina	30,51	75,11	406,14
Cefoxitina	4,93	89,80	54,93
Cefotaxima	5,21	18,96	274,62
Ceftazidima	0,42	44,81	9,34
Cefepima	0,17	85,97	1,95
Aztreonam	— <sup>b</sup>	—	—
Imipenem	0,49	1,78	275,28
Meropenem	0,052	1,23	42,28
Ertapenem	0,013	0,6	21,67

<sup>a</sup> Valores obtidos por média de três medições distintas (desvio-padrão dos valores menores que 20%)

<sup>b</sup> Não foi detectada hidrólise após 2h de incubação.

### 5.11.2 Determinação das Constantes de Inibição

Para os inibidores irreversíveis ácido clavulânico e tazobactam foram determinadas as constantes de inibição  $K_i$  e  $K_{inat}$ . Para o inibidor competitivo imipenem foi determinada a constante de inibição  $K_i$ . As constantes de inibição encontradas estão apresentadas na Tabela 7.

GES-16 foi inibida por todos os inibidores testados. Entretanto, os inibidores irreversíveis ácido clavulânico e tazobactam inibiram a atividade da enzima mais eficientemente do que o imipenem, que apresentou menor afinidade pela enzima (maior valor de  $K_i$ ).

Entre os inibidores irreversíveis, o ácido clavulânico inibiu a GES-16 ligeiramente melhor do que o tazobactam, devido ao menor valor de  $K_i$  encontrado. O  $K_{inat}$  representa o tempo que o inibidor leva para inativar a molécula de enzima irreversivelmente, e os valores de  $K_{inat}$  encontrados para ambos inibidores foram semelhantes.

**Tabela 7.** Perfil de inibição da  $\beta$ -lactamase GES-16

Inibidor	$K_i$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$K_{inat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
Ácido Clavulânico	1,38	0,00262
Tazobactam	2,92	0,00318
Imipenem	3,69	—

## 6. *DISCUSSÃO*

---

O crescente aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos habitualmente utilizados para tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde representa um grave problema de âmbito mundial, e deve-se principalmente a falhas no controle de disseminação de patógenos resistentes em ambiente hospitalar e à forte pressão seletiva exercida pelo amplo uso de antimicrobianos (Masterton, 2009). Os carbapenens são antimicrobianos frequentemente utilizados como último recurso para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes. Seu uso terapêutico aumentou significativamente nas últimas décadas devido à grande disseminação de bactérias produtoras de ESBL, e como consequência, tem sido observado um crescente aumento no surgimento de microorganismos resistentes a estes compostos. (Castanheira *et al.*, 2008; Hawkey *et al.*, 2009).

Apesar dos crescentes relatos observados, a resistência global aos carbapenens entre enterobactérias ainda é baixa. Dados do programa MYSTIC (“Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection”) publicados em 2009 e referentes a um estudo envolvendo isolados provenientes de 15 centros médicos localizados nos Estados Unidos durante os anos de 1999 a 2008 demonstraram que as taxas de sensibilidade aos carbapenens, imipenem, meropenem e ertapenem, entre todas as enterobactérias avaliadas foram 97,4%, 97,3% e 96,6%, respectivamente. Ainda, o estudo constatou que em geral as taxas de resistência aos carbapenens permaneceram baixas durante os 10 anos de estudo. Isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *Enterobacter* spp. apresentaram pequenos aumentos nas taxas de resistência nos últimos anos, devido principalmente à emergência das carbapenemases

---



KPC, e SME em menor escala, entre estes isolados (Rhomborg & Jones, 2009). Dados europeus do programa MYSTIC de 2007 corroboram a baixa frequência de enterobactérias resistentes aos carbapenens, indicando taxas de sensibilidade ao meropenem e imipenem equivalentes a 99,4% e 98,3%, respectivamente (Turner, 2009).

As amostras de *S. marcescens* incluídas neste estudo foram isoladas em 2005 a partir de secreção brônquica e sangue de cateter de dois pacientes internados na UTI do Hospital Universitário Pedro Ernesto, localizado no Rio de Janeiro. Ambos isolados apresentavam resistência aos carbapenens, a qual foi inicialmente identificada pela técnica de disco-difusão. O fenótipo encontrado era incomum para o período em questão, e nos motivou a estudar os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenens nestes isolados. Segundo Kiffer e colaboradores (2005), as taxas de resistência aos carbapenens entre enterobactérias isoladas de 20 centros brasileiros (7 em São Paulo, 2 no Rio de Janeiro, 1 em Minas Gerais, 4 no Rio Grande do Sul, 2 no Paraná, 1 em Santa Catarina, 2 na Bahia e 1 em Brasília) eram mínimas naquele período (> 0,3%), avaliado pelo programa MYSTIC em 2003. Enquanto todos os isolados de *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., e *Providencia* spp. apresentaram sensibilidade ao imipenem e ao meropenem, 99,2% dos isolados de *K. pneumoniae* eram sensíveis a estes dois carbapenens (Kiffer *et al.*, 2005).

A avaliação da similaridade genética por PFGE demonstrou a relação clonal entre os dois isolados clínicos de *S. marcescens*, indicando a ocorrência de transmissão cruzada entre pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto ou a aquisição deste patógeno via fonte comum de

---

contaminação. *S. marcescens* é um patógeno causador de infecções nosocomiais e oportunistas que tem sido responsável por surtos em UTIs, eventos associados à contaminação de aparelhos e soluções. Adicionalmente, uma vez que *S. marcescens* pode sobreviver por grandes períodos em condições de baixa umidade, como aquela encontrada na pele, sua transmissão entre diferentes pacientes pode ocorrer por meio das mãos colonizadas de profissionais de saúde (de Vries *et al.*, 2006; Maragakis *et al.*, 2008; Sartor *et al.*, 2000, Uduman *et al.*, 2002). Dessa forma, cabe ressaltar a extrema importância da correta e contínua aplicação de medidas de barreira, como isolamento de pacientes infectados, uso de luvas, lavagem das mãos e uso de avental, a fim de diminuir a disseminação de clones multirresistentes no ambiente hospitalar.

O teste de sensibilidade realizado segundo as recomendações do CLSI (2010) confirmou a resistência aos carbapenems dos isolados de *S. marcescens*, SM190 e SM191, previamente detectada pelo Laboratório de Microbiologia do HUPE pela técnica de disco-difusão. Adicionalmente, os isolados apresentaram elevado grau de resistência a outros antimicrobianos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos: entre os  $\beta$ -lactâmicos, os isolados de *S. marcescens* apresentaram-se resistentes à ticarcilina e à ceftazidima, e sensíveis à cefepima e ao aztreonam; ambos isolados apresentaram-se resistentes às quinolonas avaliadas, ciprofloxacina e ácido nalidíxico; entre os aminoglicosídeos, ambos isolados apresentaram resistência à gentamicina, enquanto o isolado SM190 apresentou sensibilidade intermediária à amicacina, e o isolado SM191 apresentou-se sensível a este antimicrobiano, devido à diferença de uma diluição nas CIMs determinadas. A

---

diferença de uma diluição nas CIMs é provavelmente decorrente de pequenas variações na técnica, e não de diferenças entre os níveis de resistência apresentados pelos isolados geneticamente idênticos.

Entre as enterobactérias, o mecanismo responsável pela resistência aos carbapenems mais prevalente é a produção de serino-carbapenemases, especialmente as do tipo KPC (Queenan & Bush, 2007). Em *S. marcescens*, além de KPC são frequentemente encontradas também as enzimas do tipo SME. Até o momento, não foram descritas  $\beta$ -lactamases do tipo OXA (“CHDL”) ou carbapenemases do tipo GES nesta espécie. Com base neste panorama, inicialmente foram realizados os testes de detecção de hidrólise enzimática do imipenem e detecção de genes codificadores das  $\beta$ -lactamases mais frequentemente encontradas em enterobactérias por PCR.

Os extratos protéicos dos isolados SM190 e SM191 apresentaram hidrólise fraca do imipenem, sendo que a degradação do referido antimicrobiano somente foi observada quando o extrato protéico foi preparado a partir de um maior inóculo de células bacterianas. A fraca hidrólise observada não correspondia ao típico padrão de degradação intensa do imipenem observada para as enzimas do tipo KPC, SME e metalo  $\beta$ -lactamases, sugerindo, portanto, a presença de carbapenemases que apresentam padrão de degradação mais amena deste antimicrobiano, como enzimas do tipo OXA ou GES.

A pesquisa dos genes codificadores de  $\beta$ -lactamases demonstrou a presença dos genes *bla*<sub>OXA-10</sub> e *bla*<sub>GES</sub> nos dois isolados de *S. marcescens*. O sequenciamento do amplicon obtido por amplificação do gene *bla*<sub>OXA-10</sub>

---

confirmou a presença do gene codificador da variante OXA-10 em ambos isolados. OXA-10 é uma oxacilinase de espectro limitado, e, portanto, não hidrolisa os carbapenems. Assim, a presença desta enzima provavelmente não contribui para a resistência a estes antimicrobianos nos isolados SM190 e SM191.

O sequenciamento do amplicon obtido por amplificação do gene *bla*<sub>GES</sub> evidenciou a presença de uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do tipo GES. Seu gene era composto por 864 nucleotídeos, codificando uma proteína de 287 aminoácidos, nomeada GES-16. O gene *bla*<sub>GES-16</sub> possui 4 alterações de nucleotídeos em relação à sequência descrita de GES-1: C por G na posição 112, G por A na posição 493, T por C na posição 591 e A por G na posição 645. Embora tenham sido detectadas 4 mutações na sequência nucleotídica, a sequência de aminoácidos de GES-16 difere da sequência de GES-1 em apenas 2 aminoácidos, possuindo, portanto, duas mutações silenciosas. GES-16 possui um resíduo de ácido glutâmico ao invés de glutamina na posição 43 de Ambler (Gln43Glu), e serina ao invés de glicina na posição 170 de Ambler (Gly170Ser) (Número de acesso no GenBank AF156486). No entanto, entre as variantes de  $\beta$ -lactamases do tipo GES descritas até o momento, GES-16 possui maior similaridade com GES-5. Em relação à sequência nucleotídica de GES-5, GES-16 possui 3 substituições: A por G na posição 54, C por G na posição 112 e A por G na posição 645. Porém, duas dessas alterações são silenciosas, e GES-16 possui apenas uma única substituição de aminoácido em relação à GES-5: o resíduo de ácido glutâmico ao invés de glutamina na posição 43 (Gln43Glu), da mesma forma como foi observado com relação à GES-1 (Número de acesso no GenBank AY494717).

---

A substituição de aminoácidos Gln43Glu não está localizada nas posições conservadas das  $\beta$ -lactamases de classe A de Ambler e, até o momento, não foi descrita em  $\beta$ -lactamases do tipo GES. Portanto, não são conhecidas as possíveis implicações desta substituição para o perfil hidrolítico da enzima. Entretanto, devido a essa substituição se tratar da única diferença entre as sequências de aminoácidos de GES-5 e GES-16, a comparação dos parâmetros cinéticos destas duas enzimas permite sugerir que tal substituição tenha provocado alterações no perfil hidrolítico, especialmente, em relação à afinidade da enzima pelos diferentes substratos. Esta premissa baseia-se na observação de diferenças observadas entre os valores de  $K_m$  apresentados pelas duas enzimas frente aos mesmos substratos: os valores de  $K_m$  de GES-16 são, de forma geral, inferiores os valores de  $K_m$  de GES-5 para todos os substratos avaliados, indicando maior afinidade de GES-16 por estes compostos. No entanto, estudos detalhados envolvendo a reversão desta substituição são necessários para confirmar seu envolvimento com as alterações sugeridas (Bae *et al.*, 2007).

A segunda substituição de aminoácidos detectada, na posição de 170 de Ambler, está localizada no interior da região  $\Omega$ -loop das  $\beta$ -lactamases de classe A de Ambler. O  $\Omega$ -loop é um elemento estrutural conservado em todas as  $\beta$ -lactamases de classe A, formado pelos resíduos 161 a 179, que forma uma das paredes da cavidade do sítio ativo da enzima. Está diretamente envolvido na reação catalítica das enzimas, pois inclui um resíduo de ácido glutâmico na posição 166 que também desempenha um papel chave na catálise enzimática (Bös & Pleiss, 2008).

---

É bem conhecido e caracterizado o envolvimento da substituição de aminoácidos na posição 170 de Ambler no aumento do espectro hidrolítico das  $\beta$ -lactamases do tipo GES. A substituição do resíduo de glicina nesta posição por resíduos de asparagina ou serina em algumas variantes ocasionou a expansão de seus espectros hidrolíticos, que passaram a incluir os carbapenems (Queenan & Bush, 2007). Frase e colaboradores (2009) avaliaram a influência da substituição da glicina na posição 170 (GES-1) por asparagina (GES-2) e serina (GES-5) nas constantes de acilação e deacilação, na afinidade do imipenem pelas enzimas e nos parâmetros cinéticos. Eles observaram que a variante GES-1, com Gly170, possui maior afinidade ao imipenem do que as outras variantes, mas não é capaz de hidrolisá-lo devido às baixas constantes de acilação e deacilação. Em GES-1, a constante de acilação é menor do que a constante de deacilação, e, portanto, a acilação torna-se o passo limitante da quebra do imipenem. A substituição da glicina por asparagina na posição 170, em GES-2, resulta em diminuição da afinidade pelo imipenem (aumento de 10 vezes em  $k_1$  e aumento de 100 vezes em  $k_{-1}$ , em relação à GES-1) e aumento de 3 vezes na constante de acilação, embora não altere a constante de deacilação. Nesta variante, as constantes de acilação e deacilação são semelhantes e, portanto, nenhuma das duas etapas é inteiramente limitante do processo. GES-5, a variante enzimática com serina na posição 170, apresentou aumento de ambas as constantes e diminuição da afinidade pelo imipenem (aumento de 10 vezes em  $k_1$  e aumento de 100 vezes em  $k_{-1}$ , em relação à GES-2). Entretanto, a alteração mais importante no perfil cinético de GES-5 foi o aumento de 5000 vezes e 1500 vezes da constante de acilação em relação às constantes de GES-1 e GES-2, respectivamente. Dessa

---

forma, em GES-5, o passo-limitante no processo passou a ser a deacilação e, neste contexto, a constante de deacilação aumentada é responsável pela hidrólise aumentada do imipenem. O aumento da taxa de acilação em conjunto com um aumento mais modesto na taxa de deacilação são críticos para a atividade carbapenemase de GES-5. Além disso, a menor afinidade de GES-5 pelo imipenem, em relação à GES-1 e GES-2, evita a indesejada possibilidade de inibição por competição com outro substrato, decorrente da alta afinidade da enzima pelo imipenem. No entanto, não está claro até o momento como as substituições de aminoácidos na posição 170 afetam as constantes de acilação e deacilação (Frase *et al.*, 2009).

Outro estudo publicado em 2010 também avaliou os efeitos das alterações de aminoácidos na posição 170 de Ambler. Este mesmo estudo avaliou também as alterações provocadas por substituições na posição 104 de Ambler, já que algumas variantes de GES apresentaram diferentes aminoácidos nestas posições (Glu ou Lys na posição 104, e Gly, Asn, ou Ser na posição 170), entre elas GES-1 (Glu104, Gly170), GES-2 (Glu104, Asn170), GES-5 (Glu104, Ser170), GES-6 (Lys104, Ser170), GES-7 (Lys104, Gly170), and GES-13 (Lys104, Asn170). Neste trabalho foram observadas alterações nas constantes cinéticas, bem como nos níveis de resistência aos antimicrobianos, indicativas de possíveis implicações das substituições de aminoácidos nas posições em questão: (i) a presença de asparagina na posição 170 ao invés de glicina (como ocorre em GES-2 e GES-13) reduz a eficiência hidrolítica contra penicilina G e cefalotina, dois antimicrobianos que comumente são bons substratos para a maioria das  $\beta$ -lactamases de classe A; (ii) um resíduo serina na posição 170 ao invés de glicina provoca, por sua vez,

---

expansão no espectro hidrolítico, que passa a incluir cefoxitina, como observado para GES-4, GES-5, GES-6 e GES-14, e agora GES-16. Esta droga possui um grupamento 7 $\alpha$ -methoxy, que é equivalente ao grupamento 6 $\alpha$ -hydroxyethyl do imipenem e parece deslocar a molécula de água que participa da reação deacilação, o que desfavorece sua clivagem pela maioria das  $\beta$ -lactamases de classe A; (iii) a substituição de glicina por asparagina ou serina na posição 170 aumenta a eficiência hidrolítica contra imipenem, assim como observado para GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-14, e também para GES-16, neste trabalho, devido aos aumentos das constantes de acilação e deacilação já explicados; (iv) um resíduo asparagina ou serina na posição 170 na presença de ácido glutâmico na posição 104 diminui a atividade hidrolítica contra oxyimino-cefalosporinas, especialmente ceftazidima; (v) a presença de lisina na posição 104 diminui a atividade carbapenemase conferida pela asparagina ou serina na posição 170, como observado em GES-6 e GES-13, respectivamente, provavelmente devido a menores taxas de acilação; (vi) um resíduo lisina na posição 104 na presença de qualquer resíduo na posição 170 (glicina, asparagina ou serina) causa um aumento na atividade contra ceftazidima quando comparado às variantes contendo um resíduo de ácido glutâmico na mesma posição, observado em GES-7, GES-13, e GES-6, respectivamente, possivelmente devido à alterações em ambas taxas de acilação e deacilação. (Kotsakis *et al.*, 2010a).

No Brasil, já foram encontradas as variantes GES-1, GES-5 e GES-7 (Castanheira *et al.*, 2004a; da Fonseca *et al.*, 2007; Dropa *et al.*, 2010). Assim, GES-16 pode ter surgido a partir de mutações no gene codificador de GES-5, que levou à única substituição de aminoácidos, Gln43Glu.

---



O gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi encontrado como cassete gênico inserido na segunda posição da região variável de um integron de classe 1. Os genes codificadores de GES até o momento foram predominantemente descritos na forma de cassetes gênicos de integrons localizados em plasmídeos. A única exceção foi descrita em 2006, na Grécia, por Galani e colaboradores, onde o gene *bla*<sub>GES-7</sub> foi identificado no cromossomo de um isolado clínico de *E. coli*, que também carregava o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> (Galani *et al.*, 2006). Os cassetes carregadores dos genes codificadores de GES são normalmente encontrados inseridos em integrons de classe 1, e há apenas 3 relatos de situações diferentes desta. A primeira descrição aconteceu em 2003, em Portugal, a partir de isolados clínicos de *K. pneumoniae*, e a segunda descrição ocorreu em 2010, na Suíça, em isolados clínicos de *E. coli*. Em ambos os casos, o gene *bla*<sub>GES-1</sub> foi encontrado como cassete gênico inserido em integron de classe 3 (Correia *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2010a). Além disso, em 2009 Poirel e colaboradores identificaram no Canadá um isolado de *E. cloacae* no qual o gene *bla*<sub>GES-5</sub> encontrava-se em um novo elemento genético nomeado “integron mobilization unit” (IMU) (Poirel *et al.*, 2009).

O integron no qual o gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi identificado possui o gene codificador da integrase truncado *IntI1*. Este gene perdeu 8 aminoácidos da sua porção N-terminal, além da região correspondente ao sítio de recombinação *attI1*, incluindo as sequências correspondentes aos promotores *P<sub>int</sub>*, que dirige a expressão do gene da integrase, e *P<sub>2</sub>*. A região perdida do gene da integrase não comprometeu a sequência correspondente ao promotor *P<sub>c</sub>*, que dirige a expressão dos cassetes gênicos, e que foi corretamente identificado na sequência do gene *IntI1* presente no integron. A análise da

---

sequência do promotor  $P_c$  indicou tratar-se de uma variante fraca, (Collins & Hall, 1995; Le'vesque *et al.*, 1994; Papagiannitsis *et al.*, 2009). O primeiro cassete gênico inserido na região variável do integron identificado foi *catB3* truncado, que encontrava-se fusionado ao gene truncado *IntI1*. A sequência de aminoácidos da proteína codificada por este cassete não apresentava os primeiros 134 aminoácidos da sua porção N-terminal. A análise das sequências codificadoras de *catB3* e *IntI1* revelou que estes genes possuíam em comum a sequência de nucleotídeos GCGGTG. Dessa forma, é provável que tenha ocorrido recombinação homóloga entre essas sequências idênticas nos genes *IntI1* e *catB3*, e todo o conteúdo presente entre as mesmas foi perdido, incluindo parte do gene da integrase, o *attI1*, e parte do gene *catB3*. À jusante do cassete gênico *catB3* estava inserido o cassete *bla*<sub>GES-16</sub>. Ainda, à jusante de *bla*<sub>GES-16</sub>, foram encontrados os cassetes *dfr22*, *aac(6')-IIC* e *aadA1*. Os cassetes gênicos identificados neste integron são frequentemente encontrados em integrons de classe 1 em Gram-negativos, conferindo resistência a diferentes classes de antibióticos nestes microorganismos (Hall & Collins, 1998).

O gene *catB3* codifica uma enzima, a cloranfenicol acetiltransferase, que adiciona grupos acetil ao cloranfenicol, neutralizando sua ação antimicrobiana (Shaw, 1984). Em contrapartida, o gene *dfr22* codifica a enzima diidrofolato redutase alterada, que causa resistência ao trimetoprim (Sköld, 2001). O cloranfenicol e o trimetoprim não foram avaliados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado com as amostras de *S. marcescens*, já que o objetivo do estudo era avaliar os mecanismos de resistência aos carbapenens, e, portanto, não pudemos observar a influência nas CIMs da presença destes

---

cassetes gênicos no integron. No entanto, é importante ressaltar que o gene *catB3* estava incompleto, e, provavelmente, sua proteína não teria sido corretamente traduzida, e não teria efeito sobre as CIMs de cloranfenicol.

Os genes *aac(6')-IIC* e *aadA1* codificam enzimas que causam resistência aos aminoglicosídeos, a aminoglicosídeo acetiltransferase e aminoglicosídeo adeniltransferase, respectivamente, por causarem modificações na molécula do antimicrobiano, impedindo sua ligação à subunidade 30S do ribossomo. A primeira enzima, acetiltransferase, adiciona grupos acetil ao antibiótico, enquanto a adeniltransferase adiciona grupos adenil aos mesmos (Ramirez & Tolmasky, 2010). No teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado com as amostras de *S. marcescens* foram incluídos os antimicrobianos amicacina e gentamicina, da classe dos aminoglicosídeos. Ambos isolados, SM190 e SM191, apresentaram resistência à gentamicina, enquanto SM190 apresentou sensibilidade intermediária à amicacina, e SM191 apresentou-se sensível a esta droga. A transferência do plasmídeo contendo o integron para cepas de *E. coli* TOP10 não provocou aumentos nas CIMs. Por serem os últimos cassetes gênicos presentes no integron (mais distais de  $P_c$ ), os genes *aac* e *aad* podem estar sendo menos expressos, e, por isso, não ocasionam aumentos nas CIMs dos transformantes. Ainda, embora o contexto genético seja diferente entre as duas bactérias avaliadas (*S. marcescens* e *E. coli*) e possa estar influenciando nas CIMs observadas, as elevadas CIMs das amostras SM190 e SM191 sugerem a presença de mecanismos adicionais de resistência aos aminoglicosídeos nestes isolados.

A perda de parte do gene da integrase, bem como do promotor  $P_{int}$ , que rege sua expressão, provavelmente acarretou na perda de funcionalidade

---

desta enzima. Com isso, acreditamos que não seja mais possível a ocorrência de eventos de recombinação sítio-específica neste integron, a menos que outra integrase, codificada por outro integron, esteja presente e reconheça os sítios de recombinação para atuação em *trans*. Além disso, acreditamos que este integron tenha perdido a capacidade de inserção ou excisão de cassetes gênicos devido à perda do sítio de recombinação *attI1*. Assim, não será mais possível a ocorrência de recombinação sítio-específica entre *attI1* e *attC* dos cassetes. Segundo Partridge e colaboradores (2000), é possível a ocorrência de recombinação-sítio específica, mediada pela integrase, entre dois *attCs* de diferentes cassetes gênicos, e dessa forma o integron carreador de *bla*<sub>GES-16</sub> não seria imutável, podendo adquirir ou eliminar cassetes da sua região variável. No entanto, esse evento ocorre de forma muito mais rara do que a recombinação entre *attI1* e *attC*. Além disso, seria necessária a presença de uma outra integrase atuando em *trans* para sua ocorrência, diminuindo ainda mais a probabilidade deste evento.

O *attC* do cassete gênico da GES-16 inserido no integron possuía 110 pb, assim como os *attCs* descritos de outros cassetes contendo genes *bla*<sub>GES</sub>. Nesta sequência foram identificadas as estruturas 1L, 2L, 1R e 2R, que participam do evento de recombinação sítio-específica, e uma sequência de Shine-Delgarno (AGGCG) localizada 48 pb à montante do códon de iniciação de *bla*<sub>GES-16</sub>.

A tradução eficiente de genes normalmente requer a presença de uma TIR localizada na região 5' não traduzível do cassete, formada por um códon de iniciação, uma sequência de Shine Delgarno (SD) e um espaçamento adequado entre elas. Entretanto, aproximadamente 20% dos cassetes gênicos

---

não possuem uma TIR. Em integrons de classe 1 a tradução de cassetes TIR-deficientes tem sido associada à tradução acoplada de uma ORF localizada no final do segmento 5'CS, responsável pelo recrutamento de ribossomos e expressão dos cassetes. (Depardieu *et al.*, 2007; Hanau-Berçot *et al.*, 2002; Jacquier *et al.*, 2009). No integron identificado neste trabalho seria impossível a expressão dos cassetes via acoplamento com a ORF que se forma após a inserção do cassete na região 3' do segmento 5'CS do integron devido à perda de parte desta região. Assim, é provável que a identificação da sequência de Shine-Delgarno no cassete da GES-16 signifique a presença da TIR (região iniciadora de tradução), fornecendo as condições necessárias para a expressão do cassete gênico.

Os genes codificadores de  $\beta$ -lactamases estão normalmente inseridos em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons, que possuem a capacidade de movimentação dentro do genoma bacteriano, ou até mesmo entre genomas de bactérias diferentes. Dessa forma, atuam na transmissão horizontal de genes, facilitando a disseminação de genes de resistência (Hall, 1997).

A localização plasmidial do gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi sugerida pela hibridização e confirmada pela obtenção de transformantes carreadores do referido gene. A extração de DNA total inclui o DNA genômico e o DNA plasmidial bacterianos, e por isso foi observada hibridização da sonda *bla*<sub>GES</sub> com ambas as extrações, de DNA total e DNA plasmidial, dos isolados SM190 e SM191.

Não foi possível utilizar os isolados clínicos como cepas doadoras nos ensaios de conjugação visto que estes isolados apresentavam crescimento em

---

concentrações superiores àquelas nas quais as cepas receptoras eram capazes de crescer, quando empregadas as drogas utilizadas como marcador de seleção para as cepas receptoras. Dessa forma, não possuíamos um marcador de seleção adequado, e foram então utilizados os transformantes como cepas doadoras, já que eles apresentam níveis de resistência mais baixos. Mesmo após inúmeras tentativas, não obtivemos sucesso nos ensaios de conjugação entre EC190 e EC191, e *E. coli* TOP10, sugerindo que o plasmídeo em questão não seja conjugativo. No entanto, é necessária a realização de experimentos adicionais para confirmar esta hipótese, preferencialmente utilizando cepas receptoras que possuam marcadores de seleção mais adequados, como marcadores metabólicos ou a resistência à outras drogas, como telurito ou bleomicina. Seria mais adequado também repetir os ensaios utilizando os isolados clínicos como doadores, visto que o contexto genético diferente entre *S. marcescens* e *E. coli* pode ter influência no sucesso da conjugação.

Mesmo que o plasmídeo seja não-conjugativo, o sucesso na sua transferência para *E. coli* por transformação reflete sua capacidade de replicação em bactérias pertencentes a diferentes gêneros. A manutenção da viabilidade do plasmídeo é importante para a propagação do material genético entre diferentes bactérias e perpetuação dos determinantes de resistência presentes nele, e adquire maior impacto quando tal plasmídeo coexiste com outros plasmídeos conjugativos na mesma célula bacteriana, podendo então ser mobilizado por eles para diferentes bactérias. Ainda, o fato de *bla*<sub>GES-16</sub> estar localizado em um integron adquire maior importância pelo fato deste integron estar inserido em um plasmídeo, já que os integrons não possuem

---

autonomia de movimentação e somente são mobilizados quando associados a outros elementos genéticos móveis, evidenciando o grande potencial de disseminação deste determinante de resistência intra- ou inter-espécies. A disseminação de determinantes de resistência como a GES-16 é o principal fator contribuinte para o aumento das taxas de resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos observado entre microrganismos Gram-negativos. Além disso, a disseminação de clones carreando determinantes de resistência, e a transferência de determinantes através da multiplicação bacteriana (transmissão vertical de genes) também assume importante papel no aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos.

A inserção de *bla*<sub>GES-16</sub> em *E. coli* TOP10, via clonagem em vetor TOPO TA<sup>®</sup> ou transformação do plasmídeo extraído das cepas parentais, evidenciou o aumento das CIMs para os agentes  $\beta$ -lactâmicos, exceto para o aztreonam, refletindo a atividade da GES-16, que não hidrolisa este monobactâmico. O aumento das CIMs dos carbapenems na cepa de *E. coli* TOP10 após inserção de *bla*<sub>GES-16</sub> indica a atividade carbapenemase de GES-16. No entanto, pudemos observar que apesar da elevação nas CIMs, a presença do gene *bla*<sub>GES-16</sub> não foi capaz de aumentar as CIMs ao mesmo nível de resistência observado nas cepas parentais de *S. marcescens*. De fato, a produção de carbapenemases, na maioria das vezes, causa somente uma pequena elevação nas CIMs dos carbapenems, assim como foi observado para GES-16. Portanto, é provável que exista a associação de diferentes mecanismos de resistência nos isolados SM190 e SM191, que, atuando conjuntamente, conferem os elevados níveis de resistência observados. A presença da OXA-10 nestes isolados não tem interferência nas CIMs das cefalosporinas de amplo

---

espectro e dos carbapenems por se tratar de uma oxacilinase de espectro limitado. A desrepressão do gene *ampC* nas cepas de *S. marcescens* justificaria as elevadas CIMs das cefalosporinas. Além disso, sua associação com mecanismos que envolvem diminuição na permeabilidade da célula bacteriana aos antimicrobianos, tais como bombas de efluxo e perda/alteração na expressão de porinas, justificaria as elevadas CIMs dos carbapenems. As  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC possuem altos valores de pI (8,5 – 9,5), e nenhuma banda correspondente à AmpC foi visualizada na focalização de ponto isoelétrico. Porém, é possível que a banda correspondente à  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC tenha saído do gel durante a corrida eletroforética, por possuir valor de ponto isoelétrico muito próximo ao valor de pH do limite superior do gradiente do gel (9,5). Não foi avaliada neste trabalho a presença de mecanismos de alteração da permeabilidade bacteriana aos antimicrobianos.

Além disso, alguns outros fatores podem ter influência nas diferenças observadas entre os níveis de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos dos isolados clínicos e dos transformantes. Primeiramente, devemos considerar a diferença de contextos genéticos entre *S. marcescens* e *E. coli*, que pode influenciar na transcrição do gene *bla*<sub>GES-16</sub> e na expressão da proteína, levando à diferenças nos níveis de resistência às drogas. Além disso, o choque elétrico aplicado na transformação (eletroporação) pode ocasionar alterações na célula bacteriana, acarretando em mudanças de características e fenótipos apresentados. Para minimizar possíveis diferenças, seria ideal a realização do teste de sensibilidade utilizando uma cepa receptora *E. coli* TOP10 também submetida ao mesmo choque elétrico aplicado às outras cepas para transformação genética. Por último, o processo de transformação pode ocasionar quebras na

---



molécula de DNA a ser internalizada (plasmídeo, nesse caso), e a perda de parte desta molécula pode implicar nos níveis de resistência observados. Acreditamos que não tenha ocorrido perda de parte da molécula de DNA durante a transformação realizada neste trabalho, já que os plasmídeos extraídos dos isolados clínicos e dos transformantes apresentaram peso molecular semelhante, como demonstrado na Figura 11. Entretanto, a quebra e perda de pequenos fragmentos do plasmídeo, contendo poucos pares de bases, não seriam detectadas por eletroforese e podem ter ocorrido.

A associação do inibidor de serino- $\beta$ -lactamases ácido clavulânico aos carbapenems e à ticarcilina no teste de sensibilidade não provocou diminuição das CIMs nos isolados clínicos de *S. marcescens*, para nenhuma das associações, reforçando a hipótese da presença de mecanismos de resistência associados nestes isolados. Em contrapartida, na cepa EC-REC, o ácido clavulânico foi capaz de provocar diminuição nas CIMs nas associações com todos os carbapenems testados por inibição da atividade da GES-16, enquanto nos transformantes apenas nas associações com ertapenem e meropenem foram observadas diminuições nas CIMs. É possível que, na associação com a ticarcilina, a faixa de concentrações avaliadas no teste de sensibilidade não permitiu a visualização da diminuição nas CIMs com a adição do ácido clavulânico. No entanto, era esperada uma maior diminuição nas CIMs do imipenem associado ao ácido clavulânico para os transformantes.

É bastante comum a ocorrência e acúmulo de mutações nas enzimas alvo dos antimicrobianos da classe das quinolonas em bactérias, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV, além da existência de outros mecanismos de resistência a estas drogas, como alteração da permeabilidade (perda de

---

porinas e expressão de sistemas de efluxo) e produção de proteínas que protegem as enzimas alvo da inibição pelas quinolonas (mediada por plasmídeos) (Jacoby, 2005). Não foi o objetivo deste estudo a pesquisa dos mecanismos de resistência às quinolonas, e, portanto, não sabemos a causa da resistência a estas drogas nos isolados de *S. marcescens*. No entanto, a transferência do plasmídeo carreador de *bla*<sub>GES-16</sub> não alterou as CIMs das quinolonas nas cepas receptoras de *E. coli* TOP10, o que indica que o mecanismo de resistência às quinolonas não estava presente neste plasmídeo. Assim, acreditamos ser possível a existência de mutações nas regiões QRDR (“quinolone resistance determining region”) dos genes que codificam DNA girase e DNA topoisomerase IV.

A focalização de pl demonstrou a presença de uma banda adicional no extrato protéico de EC-REC com valor de pl igual a 5,4, que se trata da  $\beta$ -lactamase TEM-1. O gene codificador desta  $\beta$ -lactamase é utilizado como marcador de seleção no vetor TOPO TA<sup>®</sup>, e causa resistência à ampicilina. Embora esteja presente o gene codificador desta outra  $\beta$ -lactamase no vetor no qual *bla*<sub>GES-16</sub> foi clonado, as CIMs obtidas no teste de sensibilidade realizado com EC-REC referem-se somente à ação de GES-16, visto que TEM-1 é uma  $\beta$ -lactamase de espectro limitado e não possui ação frente aos antibióticos testados (cefalosporinas de amplo espectro e carbapenens), com exceção da ticarcilina. Ainda, a concordância dos resultados do teste de sensibilidade obtidos para EC-REC e para os transformantes, onde não está presente nenhuma outra  $\beta$ -lactamase além de GES-16, corroboram esta afirmação.

O pl obtido experimentalmente para GES-16 (5,6) não corresponde ao valor estimado por programas de computador, tais como o EditSeq (Lasergene

---

Software Package, DNASTar, Madison, EUA), quando é inserida a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene *bla*<sub>GES-16</sub> (aproximadamente 6,2). Isso acontece porque as  $\beta$ -lactamases, *in vivo*, sofrem um processamento, perdendo alguns aminoácidos da sua porção N-terminal. A sequência de aminoácidos perdida é responsável pelo endereçamento dessas enzimas ao espaço periplasmático, e são conhecidas como peptídeo-sinal. Assim, após perder alguns aminoácidos de sua sequência, as  $\beta$ -lactamases têm seu pI modificado, e portanto diferentes do valor teórico estimado com base nas suas sequências deduzidas de aminoácidos, como observado para GES-16. Além disso, pequenas variações para este valor de pI encontrado para GES-16 são aceitas e podem ser consideradas, visto que trata-se um de valor obtido experimentalmente através do cálculo a partir de uma curva de regressão linear, onde podem existir pequenos erros, embora a correlação da curva de regressão linear obtida neste trabalho tenha sido excelente ( $R^2=0,9944$ ).

A segunda banda observada nos extratos protéicos de SM190, SM191, EC190, EC191 e EC-REC, com valor de pI igual a 4,9, possivelmente trata-se de produto de degradação da enzima GES-16, já que certamente em EC-REC somente está presente esta  $\beta$ -lactamase, clonada no vetor, além de TEM-1, que foi corretamente visualizada no gel. A banda correspondente à  $\beta$ -lactamase OXA-10 nos isolados de *S. marcescens* não foi observada na focalização de pI (pI OXA-10 = 6,1), e esta  $\beta$ -lactamase pode não estar sendo expressa nestes isolados.

Os parâmetros cinéticos obtidos para GES-16 demonstraram o amplo espectro hidrolítico desta enzima, que inclui penicilinas, cefamicinas,

---

cefalosporinas, inclusive as de amplo espectro, e os carbapenens. No entanto, GES-16 não foi capaz de hidrolisar o aztreonam.

Nas  $\beta$ -lactamases do tipo GES, a substituição de aminoácidos na posição 243 de Ambler está relacionada à inclusão do aztreonam no espectro hidrolítico destas enzimas (Bogaerts *et al.*, 2010). A substituição do resíduo de glicina (GES-1) por serina (GES-9) ou alanina (GES-11, -12 e -14) leva à hidrólise do aztreonam. GES-16, assim como GES-1, possui um resíduo de glicina nesta posição, e, portanto, sua inabilidade em hidrolisar este antimicrobiano é concordante com sua sequência de aminoácidos.

Conforme já foi citado, Kotsakis e colaboradores publicaram um estudo em 2010 onde os resultados encontrados indicavam a influência da substituição de aminoácidos na posição 170 de Ambler em  $\beta$ -lactamases do tipo GES. Assim como Kotsakis e colaboradores sugeriram, a presença da serina na posição 170 de Ambler na GES-16 provocou um aumento na atividade hidrolítica contra a cefoxitina e os carbapenens, conferindo a atividade carbapenemase desta enzima. Este efeito já havia sido previamente observado em GES-5 e GES-14 (Vourli *et al.*, 2004; Bogaerts *et al.*, 2010). Além disso, observamos também uma diminuída hidrólise de ceftazidima, representada pelo baixo valor de  $k_{cat}/K_m$  ( $9,34 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), possivelmente decorrente da presença serina na posição 170 juntamente com um ácido glutâmico na posição 104, de acordo com as proposições sugeridas por Kotsakis e colaboradores (Kotsakis *et al.*, 2010a).

No entanto, este baixo valor de  $k_{cat}/K_m$  observado para ceftazidima não é concordante com os resultados do teste de sensibilidade. Tanto a transferência

---

do plasmídeo carreador de *bla*<sub>GES-16</sub> quanto a inserção do vetor TOPO TA<sup>®</sup> contendo *bla*<sub>GES-16</sub> clonado em *E. coli* TOP10 ocasionaram aumentos de 5 diluições nas CIMs, elevando-as aos mesmos níveis de resistência observados nos isolados clínicos de *S. marcescens*, o que seria sugestivo de uma hidrólise eficiente de ceftazidima por GES-16.

Assim como observado no teste de sensibilidade para EC190, EC191 e EC-REC, no geral, os parâmetros cinéticos indicam que GES-16 hidrolisa melhor as penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, seguido pelas cefalosporinas de terceira e quarta gerações, respectivamente. Embora os resultados do teste de sensibilidade e os parâmetros cinéticos obtidos para as penicilinas e cefalosporinas tenham sido concordantes, não pudemos observar a mesma concordância em relação aos resultados dos carbapenens. Enquanto o teste de sensibilidade indica que GES-16 possui maior atividade sobre o ertapenem, seguido por meropenem e imipenem, pois apresentaram aumentos de 5, 4 e 2 diluições, respectivamente, após transferência do gene *bla*<sub>GES-16</sub>, os parâmetros cinéticos demonstram o oposto: GES-16 hidrolisa melhor imipenem, seguido por meropenem e ertapenem. Esta discrepância entre os resultados pode ser devido ao fato que o teste de sensibilidade foi realizado com os sais dos antimicrobianos disponíveis comercialmente nas farmácias, e os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando os sais puros de antimicrobianos, adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Nos sais adquiridos na farmácia, o imipenem possui 50% de pureza; o meropenem possui 87,7% de pureza; e o ertapenem possui 95,6% de pureza. Podemos observar que quanto maior a impureza do antimicrobiano, menor é a sua hidrólise pela GES-16 no teste de sensibilidade, sugerindo que a presença dos

---

agentes excipientes responsáveis pela impureza dos compostos pode ter influenciado no teste de sensibilidade, embora as correções para a correta concentração de cada droga tenham sido feitas. Além disso, é importante ressaltar que o teste de sensibilidade representa o que acontece no interior da célula bacteriana, enquanto os parâmetros cinéticos foram obtidos em ensaios *in vitro*, com a enzima purificada e ausência de outros agentes interferentes, como proteínas presentes no espaço periplasmático, e por isso, diferenças são aceitáveis.

As constantes de inibição demonstraram que GES-16 é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase ácido clavulânico e tazobactam. O antimicrobiano imipenem atua como inibidor competitivo reversível devido à sua alta afinidade pela enzima, representada pelo baixo  $K_m$  encontrado. No entanto, o imipenem inibe a GES-16 em menor grau que os inibidores irreversíveis. Um estudo publicado recentemente por Frase e colaboradores (2011) demonstrou a importância do aminoácido presente na posição 170 de Ambler na inibição das  $\beta$ -lactamases do tipo GES pelo ácido clavulânico. Neste trabalho, eles observaram que a presença da asparagina, presente nas variantes GES-2 e GES-13, aumenta a inibição da enzima pelo ácido clavulânico por apresentar maior afinidade ao inibidor e menor razão de partição (“partition ratio”, é definido como o número de moléculas de inibidor hidrolisadas pela enzima antes de ocorrer sua inativação irreversível. Quanto melhor é a enzima em escapar da inativação irreversível hidrolisando o inibidor, maior a razão de partição.), já que a asparagina é o aminoácido encontrado na posição 170 na maioria das  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler e atua ancorando a molécula de água da deacilação no sítio ativo. As variantes que possuem glicina ou

---

serina nesta posição, como é o caso de GES-16, são inibidas em menor escala pelo ácido clavulânico, devido à menor afinidade do inibidor pela enzima à custa de menores razões de partição (Frase *et al.*, 2011).

Não é possível comparar parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho para GES-16 com os parâmetros publicados para outras variantes de GES já que as condições experimentais empregadas em cada caso são diferentes. A técnica de espectrofotometria de luz UV (ultravioleta) utilizada para leitura da degradação dos antimicrobianos pelas enzimas e obtenção dos parâmetros cinéticos não é muito sensível, e assim, pequenas variações de calibração entre diferentes aparelhos podem implicar em diferenças nos valores obtidos. Desta forma, seria necessário um estudo onde todas as variantes fossem avaliadas sob as mesmas condições experimentais, e as leituras fossem realizadas em um mesmo espectrofotômetro a fim de obtermos dados comparativos sobre quais variantes hidrolisam melhor determinado substrato, ou quais variantes são melhor inibidas por determinado agente, por exemplo.

O recente aumento nas descrições de novas  $\beta$ -lactamases, especialmente aquelas com atividade sobre os carbapenens, indica a evolução contínua destes determinantes de resistência em direção a um maior espectro de atividade. O gene *bla*<sub>GES-16</sub> foi encontrado em um integron de classe 1 presente em um plasmídeo que se manteve viável após transferência para uma bactéria pertencente a um gênero diferente, o que demonstra seu grande potencial de disseminação para outras espécies de enterobactérias, e até mesmo para outros tipos de bactérias. O crescente surgimento e disseminação destes determinantes de resistência é atualmente uma das questões mais preocupantes no ambiente hospitalar. Por isso, a compreensão dos

---

mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos nos fenótipos de multirresistência é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias para prevenção da ocorrência destes eventos no futuro.

---



## *7. CONCLUSÃO*

---

- A análise da similaridade genética por PFGE demonstrou a relação clonal entre os isolados clínicos de *S. marcescens* avaliados neste estudo;
  - O teste de sensibilidade aos antimicrobianos confirmou a resistência aos carbapenems dos dois isolados clínicos de *S. marcescens*. Ambos isolados apresentaram também resistência à ticarcilina, à ceftazidima, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico, mas apresentaram-se sensíveis à cefepima e ao aztreonam;
  - Apesar de o gene *bla*<sub>OXA-10</sub> ter sido detectado por PCR nos isolados SM190 e SM191, a banda correspondente à esta  $\beta$ -lactamase não foi observada na focalização de pl, e portanto, possivelmente, OXA-10 não está sendo expressa nestes isolados. Além disto, OXA-10 é uma oxacilinase de espectro limitado e não contribui para a resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenems observada nestes isolados;
  - Neste estudo foi identificada uma nova variante de GES com atividade hidrolítica sobre os carbapenems, a qual foi nomeada GES-16. A sequência codificadora de GES-16 foi depositada no GenBank com número de acesso HM173356;
  - O gene *bla*<sub>GES-16</sub> apresenta quatro mutações de nucleotídeos em relação à sequência de *bla*<sub>GES-1</sub>, que resultaram em duas alterações, G170S e Q43E, na sequência de aminoácidos da enzima;
  - *bla*<sub>GES-16</sub> está inserido em um integron de classe 1 desprovido de *attI1* e que possui o gene da integrase truncado;
-

- Embora tenhamos evidenciado a localização plasmidial de *bla*<sub>GES-16</sub>, este plasmídeo não apresentou capacidade conjugativa nos experimentos realizados. Porém, sua estabilidade em outro gênero bacteriano foi demonstrada e denota sua ampla gama de possíveis hospedeiros quando mobilizado. Esta observação somada ao fato de *bla*<sub>GES-16</sub> estar na forma de um cassete gênico inserido em um integron evidencia o potencial de disseminação deste determinante de resistência intra- ou inter-espécies;
  - A transferência do gene *bla*<sub>GES-16</sub> para *E. coli* TOP10 evidenciou o aumento das CIMs para os agentes  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenens, mas não para o aztreonam, refletindo a atividade da GES-16. No entanto, tal transferência não foi capaz de aumentar as CIMs ao mesmo nível de resistência observado nas cepas parentais de *S. marcescens*, indicando a provável presença de mecanismos de resistência associados atuando conjuntamente;
  - GES-16 possui pl igual a 5,6;
  - Os parâmetros cinéticos obtidos, bem como os resultados do teste de sensibilidade, demonstram que GES-16 hidrolisa as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenens, mas não o monobactâmico aztreonam. O perfil de inibição demonstra que GES-16 é inibida pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Além disso, o imipenem atua como inibidor competitivo reversível por apresentar alta afinidade à enzima.
-

## *8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

**Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG.** 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 15; 276:269-70.

**Ambler RP.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036):321-331.

**Bae IK, Lee YN, Jeong SH, Hong SG, Lee JH, Lee SH, Kim HJ, Youn H.** 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58(4):465-468.

**Banerjee S, Pieper U, Kapadia G, Pannell LK, Herzberg O.** 1998. Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase. *Biochemistry.* 37(10):3286-3296.

**Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M.** 2002. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother.* 50(3):393-396.

**Begic S & Worobec EA.** 2008. Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can J Microbiol.* 54(5):411-416.

**Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissou B, Nordmann P, Glupczynski Y.** 2010. GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(11):4872-4878.

**Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, Sirot J.** 2000. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(11):3061-3068.

**Bös F & Pleiss J.** 2008. Conserved water molecules stabilize the Omega-loop in class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(3):1072-1079.

**Bouvier M, Demarre G, Mazel D.** 2005. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* (24):4356-4367.

**Bush K & Jacoby GA.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):969-976.

**Bush K.** 2001. New  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 32(7):1085-1089.

---

**Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC.** 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother. 65(2):249-251.

**Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN.** 2008. Antimicrobial activity of tigecycline and other broad spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother. 52(2):570-573.

**Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN.** 2004a. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother. 48(6):2344-2345.

**Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR.** 2004b. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 48(12): 4654-4661.

**Celenza G, Luzi C, Aschi M, Segatore B, Setacci D, Pellegrini C, Forcella C, Amicosante G, Perilli M.** 2008. Natural D240G Toho-1 mutant conferring resistance to ceftazidime: biochemical characterization of CTX-M-43. J Antimicrob Chemother. 62(5):991-997.

**Centrón D & Roy PH.** 2002. Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. Antimicrob Agents Chemother. 46(5):1402-1409.

**Chen J, Kuroda T, Huda MN, Mizushima T, Tsuchiya T.** 2003. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother. 52(2):176-179.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Eighth edition (M7-A8). Wayne, PA.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Information Supplement (M100-S20). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Collis CM & Hall RM.** 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother. 39(1):155-162.

---

**Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM.** 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* 9(1):41-52.

**Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM.** 1998. Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol.* 29(2):477-490.

**Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, Mendo S, Duarte A.** 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(9):2838-2343.

**Crowder MW, Spencer J, Vila AJ.** 2006. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc Chem Res.* 39(10):721-728.

**Cunha RL, Gouvêa IE, Feitosa GP, Alves MF, Brömme D, Comasseto JV, Tersariol IL, Juliano L.** 2009. Irreversible inhibition of human cathepsins B, L, S and K by hypervalent tellurium compounds. *Biol Chem.* 390, 1205-1212.

**da Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC.** 2007. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 59(3):576-577.

**da Fonseca.** 2009. Expressão de genes de resistência intrínsecos e adquiridos em *Pseudomonas aeruginosa* e funcionalidade de cassetes gênicos associados a integrons classe 1. 160f. Tese (Doutorado) – Pós graduação em biologia parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

**de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP.** 2006. Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 27(11):1153-1158.

**Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev.* 20(1):79-114.

**Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS.** 2006a. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 12(4):223-230.

**Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN.** 2006b. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report

from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 56(4):367-372.

**Devlin TM.** 2007. Enzimas: classificação, cinética e controle, p. 358-406. Em *Manual de bioquímica com correlações clínica*; 6ª ed. São Paulo: Edgard Blücher.

**Drawz SM & Bonomo RA.** 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 23(1):160-201.

**Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH.** 2010. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 16(6):630-632.

**Duarte A, Boavida F, Grosso F, Correia M, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ.** 2003. Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(4):1481-1482.

**Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, Sirot J.** 2002. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(2):534-537.

**El Salabi A, Tolenam M, Walsh TR.** 2009. Novel subclass of a group B1 metallo- $\beta$ -lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. 49<sup>th</sup> Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco - CA, USA. Setembro 12-15, 2009. Poster C1-1365.

**Euzéby, J.P.** 2011. List of bacterial names with standing in nomenclature. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>

**Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM.** 2007. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press. p.649-669.

**Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Picazo JJ, Baquero F.** 1992. 1st Spanish epidemic of plasmid resistance to 3d generation cephalosporins: the implication of SHV-2. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 10(8):456-461.

**Frase H, Shi Q, Testero SA, Mobashery S, Vakulenko SB.** 2009. Mechanistic basis for the emergence of catalytic competence against carbapenem antibiotics by the GES family of beta-lactamases. *J Biol Chem*. 284(43):29509-29513.

---



- Frase H, Toth M, Champion MM, Antunes NT, Vakulenko SB.** 2011. Importance of Position 170 in the Inhibition of GES-Type {beta}-Lactamases by Clavulanic Acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(4):1556-1562.
- Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysouli Z, Giamarellou H.** 2006. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. *J Antimicrob Chemother.* 58:432-433.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS.** 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 52(4): 699-702.
- Garza-González E, Mendoza Ibarra SI, Llaca-Díaz JM, Gonzalez GM.** 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 60:84-90.
- Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E.** 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(9):2247-2253.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** 2011. Diversity of Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum {beta}-Lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(3):1256-1261.
- Giuliani F, Docquier JD, Riccio ML, Pagani L, Rossolini GM.** 2005. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(5):1973-1980.
- Gunkel AG, Hechler U, Martin HH.** 1991. State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens* highly resistant to extended-spectrum beta-lactams. *J Gen Microbiol.* 137(2):243-252.
- Gutmann L & Chabbert YA.** 1984. Different mechanisms of resistance to latamoxef (moxalactam) in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.* 13(1):15-22.
- Hall RM & Collis CM.** 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1(2):109-119.
- Hall RM.** 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp.* 207:192-202.
-

**Hanau-Berçot B, Podglajen I, Casin I, Collatz E.** 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol.* 44(1):119-130.

**Hata M, Fujii Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Ishii M, Neya S, Tsuda M, Hoshino T.** 2006. Substrate deacylation mechanisms of serine-beta-lactamases. *Biol Pharm Bull.* 29(11):2151-2159.

**Hawkey PM & Jones AM.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 64 Suppl 1:3-10.

**Hidri N, Barnaud G, Decré D, Cerceau C, Lalande V, Petit JC, Labia R, Arlet G.** 2005. Resistance to ceftazidime is associated with a S220Y substitution in the omega loop of the AmpC beta-lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 55(4):496-499.

**Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H.** 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12): 5035-5038.

**Hu Z & Zhao WH.** 2009. Identification of plasmid- and integron-borne blaIMP-1 and blaIMP-10 in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol.* 58(Pt 2):217-221.

**Jacoby GA.** 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2:S120-126.

**Jacoby GA.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22(1):161-182.

**Jacquier H, Zaoui C, Sanson-le Pors MJ, Mazel D, Berçot B.** 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Mol Microbiol.* 72(6):1475-1486.

**Jeong SH, Bae IK, Kim D, Hong SG, Song JS, Lee JH, Lee SH.** 2005. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11):4809-4810.

**Jones RN, Deshpande LM, Bell JM, Turnidge JD, Kohno S, Hirakata Y, Ono Y, Miyazawa Y, Kawakama S, Inoue M, Hirata Y, Toleman MA.** 2004. Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49(4):289-294.

**Kieser, T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:19-36.

---

**Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, Mendes C; MYSTIC Brazil Group.** 2005. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis.* 9(3):216-224.

**Kim J & Lim YM.** 2005. Prevalence of derepressed ampC mutants and extended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., and *Serratia marcescens* in Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM-52, and SHV-12. *J Clin Microbiol.* 43(5):2452-2455.

**Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY.** 2005. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1572-1575.

**Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouvelekis LS.** 2010a. Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at Ambler positions 104 and 170 in GES  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(11):4864-4871.

**Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouvelekis LS.** 2010b. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):1331-1333.

**Kumar A & Worobec EA.** 2005. Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1495-1501.

**Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM.** 1999. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7): 1584-1590.

**Le´vesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH.** 1994. Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* 142:49–54.

**Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y.** 2005. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11):4485-4491.

**Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH.** 2008. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* 32(6):475-480.

---

- Lee SH & Jeong SH.** 2005. Nomenclature of GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(5): 2148-2150.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM.** 1995. Enzimas, p. 147-178. Em *Princípios de Bioquímica*; 2ª edição. São Paulo: Sarvier.
- Lima KV, Carvalho RG, Carneiro IC, Lima JL, Sousa C de O, Loureiro EC, Sá LL, Bastos FC.** 2011. Outbreak of neonatal infection by an endemic clone of *Serratia marcescens*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 44(1):106-109.
- Livermore DM & Woodford N.** 2006. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 14(9): 413-420.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP.** 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 48 Suppl 1:87-102.
- Livermore DM.** 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Ver*. 8(4):557-584.
- Livermore DM.** 2002 The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 3(2):218-224.
- Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T.** 2006. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis*. 43(3):26-28.
- Mammeri H, Poirel L, Bemer P, Drugeon H, Nordmann P.** 2004. Resistance to cefepime and ceftazidime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC beta-lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(3):716-720.
- Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carroll KC, Perl TM.** 2008. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 29(5):418-423.
- Marumo K, Nagaki T, Nakamura Y.** 1996. Evaluation of high-level carbapenem resistance in atypical *Serratia marcescens* by a comparison with its revertants. *J Antimicrob Chemother*. 38(1):47-58.
- Masterton RG.** 2009. The new treatment paradigm and the role of carbapenems. *Int J Antimicrob Agents*. 33(2): 105-110.
- Mata C, Miró E, Mirelis B, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Coll P, Navarro F.** 2010. In vivo transmission of a plasmid coharbouring bla and qnrB genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett*. 308(1):24-28.
-

**Matsumura N, Minami S, Mitsuhashi S.** 1998. Sequences of homologous beta-lactamases from clinical isolates of *Serratia marcescens* with different substrate specificities. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(1):176-179.

**Matsuo T, Chen J, Minato Y, Ogawa W, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2008. SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 190(2):648-654.

**Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouvelekis LS.** 2001. An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother.* 48(5):627-630.

**Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari ACC, Tufik S.** 2007. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45:544-547.

**Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL.** 2007. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol.* 54(5):335-341.

**Minato Y, Shahcheraghi F, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2008. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol Pharm Bull.* 31(3):516-519.

**Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T.** 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(8):3579-3581.

**Naas T, Poirel L, Nordmann P.** 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1:42-52.

**Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P.** 1994. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(6):1262-1270.

**Nagano, N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y.** 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing in *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* 42:3978-3984.

**Naumiuk L, Baraniak A, Gniadkowski M, Krawczyk B, Rybak B, Sadowy E, Samet A, Kur J.** 2004. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdańsk, Poland, over a 5-year period. *J Clin Microbiol.* 42(7):3108-3116.

**Neuwirth C, Siebor E, Pechinot A, Duez JM, Pruneaux M, Garel F, Kazmierczak A, Labia R.** 2001. Evidence of in vivo transfer of a plasmid

encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 39(5):1985-1988.

**Nordmann P & Poirel L.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin. Microbiol. Infect. 8: 321-331.

**Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis; 9:228-236.

**Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N.** 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 38(1): 71-78.

**Pagès JM, James CE, Winterhalter M.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 6(12):893-903.

**Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Miriagou V.** 2009. Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter. Antimicrob Agents Chemother. 53(1):277-280.

**Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol. Rev.33: 757:784.

**Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM.** 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. Microbiology. 146 ( Pt 11):2855-2864.

**Payne DJ, Marriott MS, Amyes SG.** 1991. Plasmid mediated ceftazidime resistance identified in a strain of *Serratia marcescens* isolated in Belgium. J Antimicrob Chemother. 27(5):689-693.

**Pellegrino FL, Netto-dos Santos KR, Riley LW, Moreira BM.** 2006. BlaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 10(4):251-253.

**Pérez-Pérez FJ & Hanson ND.** 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 40(6):2153-4162.

**Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, Stefani S, Amicosante G.** 2008. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum

beta-lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(3):915-919.

**Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J.** 1990. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(2):219-224.

**Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS.** 1992. Molecular Biology - PFGE Analysis of chromosomal restriction fragments. In: Isenberg HD – *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, ASM Press, p.10.5.c.1-10.5.c.11.

**Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P.** 2009. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(9):3908-3913.

**Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC.** 2010. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 65(4):796-797.

**Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P.** 2005. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3593-3597.

**Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P.** 2010a. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 65(8):1594-1598.

**Poirel L, Carrer A, Pitout JD, Nordmann P.** 2009. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2492-2498.

**Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P.** 2002a. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 566-569.

**Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:15-22.

**Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:622-632.

**Poirel L, Naas T, Nordmann P.** 2010b. Class D beta-lactamases: Diversity, Epidemiology and Genetics. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(1):24-38.

---

**Poirel L, Pitout JD, Nordmann P.** 2007a. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*; 2(5):501-512.

**Poirel L, Rodriguez-Martinez J, al Naiemi N, Debets-Ossenkopp Y, Nodmann P.** 2010c. Characterization of DIM-1, an integron-encoding metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(6): 2420-2424.

**Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P.** 2002b. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 49(3):561-565.

**Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P.** 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemoter.* 45:2598-2603.

**Poirel L, Wenger A, Bille J, Bernabeu S, Naas T, Nordmann P.** 2007b. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(6): 2282-2283.

**Poole K.** 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 61(17):2200-2223.

**Queenan AM & K Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20(3): 440-458.

**Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J.** 2006. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(10):3485-3487.

**Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K.** 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 44(11):3035-3039.

**Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, Gutkind G; Microbiology Study Group.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(9):2864-2867.

**Ramirez MS & Tolmasky ME.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 13(6):151-171.

**Recchia GD, Stokes HW, Hall RM.** 1994. Characterization of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 22(11):2071-2078.

---



**Rhomberg PR & Jones RN.** 2009. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 65(4):414-426.

**Rowe-Magnus DA & Mazel D.** 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* 4(5):565-569.

**Ruiz N, Montero T, Hernandez-Borrell J, Viñas M.** 2003. The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. *Microb Drug Resist.* Fall; 9(3):257-264.

**Sartor C, Jacomo V, Duvivier C, Tissot-Dupont H, Sambuc R, Drancourt M.** 2000. Nosocomial *Serratia marcescens* infections associated with extrinsic contamination of a liquid nonmedicated soap. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 21:196-199.

**Sekiguchi JI, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T.** 2008. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(11): 4194-4197.

**Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM.** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol.* 57(6): 493-495.

**Shahcheraghi F, Minato Y, Chen J, Mizushima T, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2007. Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biol Pharm Bull.* 30(4):798-800.

**Shaw WV.** 1984. Bacterial resistance to chloramphenicol. *Br Med Bull.* 40(1):36-41.

**Sköld O.** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 32(3-4):261-273.

**Stokes HW & Hall RM.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.

**Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM.** 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol.* 26(4):731-745.

**Suh B, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Lee K.** 2010. Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(12):5057-5061.

---

**Tamilselvi A & Mugesh G.** 2008. Zinc and antibiotic resistance: metallo-beta-lactamases and their synthetic analogues. *J Biol Inorg Chem.* 13(7):1039-53.

**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995 Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.

**Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR.** 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 50(5): 673-679.

**Turner PJ.** 2009. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63(2):217-222.

**Uduman SA, Farrukh AS, Nath KN, Zuhair MY, Ifrah A, Khawla AD, Sunita P.** 2002. An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a special-care baby unit of a community hospital in United Arab Emirates: the importance of the air conditioner duct as a nosocomial reservoir. *J Hosp Infect.* 52:175-180.

**Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coşkun F.** 1998. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 36:827-829.

**Von Dolinger Brito D, Matos C, Abdalla V V, DA Filho, Pinto Gontijo P Filho.** 1999. An Outbreak of Nosocomial Infection Caused by ESBLs Producing *Serratia marcescens* in a Brazilian Neonatal Unit. *Braz J Infect Dis.* 3(4):149-155.

**Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS.** 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 234(2):209-213.

**Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Arakawa Y.** 2004a. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(8):2905-2910.

**Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Ito H, Arakawa Y.** 2004b. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class a beta-lactamase, GES-3, in a

neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6):1960-1967.

**Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 18(2): 306-325.

**Walsh TR.** 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* 21(4): 367-371.

**Walther-Rasmussen J & Hoiby N.** 2007. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 60(3):470-482.

**Weindorf H, Schmidt H, Martin HH.** 1998. Contribution of overproduced chromosomal beta-lactamase and defective outer membrane porins to resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.* 41(2):189-195.

**Wilkinson GN.** 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80, 324–332.

**Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM.** 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Inter. J. Antimicrob. Agents.* 27: 351-353.

**Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R, Kinoshita S, Aihara M.** 2003. Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother.* 51(3):631-638.

**Yamasaki K, Nishio H, Komatsu M, Satoh K, Yamashita T, Washidu R, Shimakawa K, Kinoshita S, Ura T, Aihara M.** 2002. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase types among clinical isolates during January and February 2000 in the Kinki area of Japan. *Jpn J Antibiot.* 55 Suppl A:65-78.

**Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM.** 1990. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(5):755-758.

**Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M.** 2001. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(5):1343-1348.

**Yatsuyanagi J, Saito S, Konno T, Harata S, Suzuki N, Kato J, Amano K.** 2006. Nosocomial outbreak of ceftazidime-resistant *Serratia marcescens*

strains that produce a chromosomal AmpC variant with N235K substitution. *Jpn J Infect Dis.* 59(3):153-159.

**Yigit, H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing betalactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(4): 1151–1161. (Erratum, 52(2): 809, 2008.)

**Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR.** 2007. A Novel Sub-Group Metallo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L), AIM-1 Emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 47th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Setembro 17-20, 2007. Poster C1-539.

**Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12): 5046-5054.

**Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Chen HE, Lee CC, Chuang YC.** 2008. Institutional spread of clonally related *Serratia marcescens* isolates with a novel AmpC cephalosporinase (S4): a 4-year experience in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 61(4):460-467.

**Yum JH, Yong D, Lee K, Kim HS, Chong Y.** 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 42(3):217-219.

**Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL.** 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 56(6): 1148-1151.

**Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Chen GX.** 2007. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother.* 59(3):574-576.

**Zhao WH, Hu ZQ, Chen G, Matsushita K, Fukuchi K, Shimamura T.** 2007. Characterization of imipenem-resistant *Serratia marcescens* producing IMP-type and TEM-type beta-lactamases encoded on a single plasmid. *Microbiol Res.* 62(1):46-52.

---

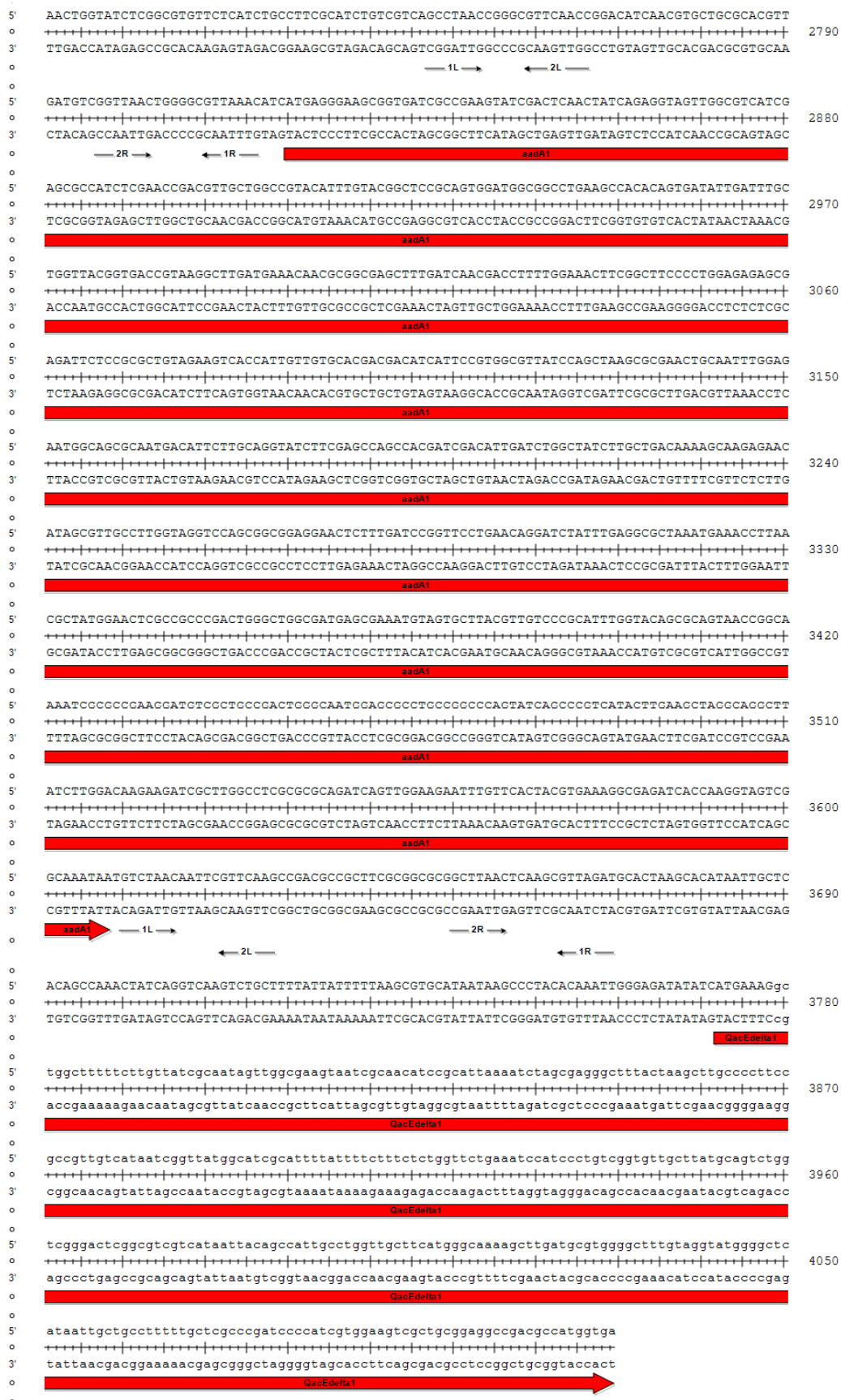
## 9. *ANEXOS*

---

### Sequência de Nucleotídeos do Integron Contendo *bla*<sub>GES-16</sub>







**Figura Anexo 1.** Sequência de nucleotídeos do integron contendo *bla*<sub>GES-16</sub>. Os cassetes gênicos estão identificados por setas, indicando o sentido da transcrição. Os domínios 1L, 2L, 1R e 2R dos *attCs* e o promotor *P<sub>c</sub>* estão identificados.



**Anexo II****Artigo Científico****Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-type  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*.**Paula Peraro Barbosa<sup>1</sup>Renata Cristina Picão<sup>1</sup>Marcelo F. Marcondes<sup>2</sup>Vitor Oliveira<sup>2</sup>Elisa Costa Pinto<sup>3</sup>Elizabeth A. Marques<sup>3</sup>Ana Cristina Gales<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>3</sup>Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running Title: Characterization of a new GES-type carbapenemase

Keywords: Enterobacteriaceae, antimicrobial resistance, carbapenems, beta-lactams

\*Corresponding author: Ana Cristina Gales  
Rua Pedro de Toledo, 781 - 6º andar  
São Paulo – SP, Brazil  
03940-030  
Phone/Fax: +55-11-5576-4748  
E-mail: ana.gales@gmail.com

---

---

**ABSTRACT**

**Objectives:** To characterize a new GES-type enzyme identified in two clonally related *S. marcescens* clinical isolates showing carbapenem resistance from Rio de Janeiro, Brazil.

**Methods:** Detection of  $\beta$ -lactamase encoding genes and characterization of *bla*<sub>GES</sub> and its genetic context were carried out by PCR and sequencing. Antimicrobial susceptibility profile was determined by CLSI broth microdilution. Hydrolytic profile of purified GES-16 was assessed by spectrophotometric assays.

**Results:** PCR and amplicon sequencing identified *bla*<sub>GES-16</sub> that encodes a new GES variant named GES-16. The referred gene had 4 nucleotide substitutions in comparison to that of *bla*<sub>GES-1</sub>, resulting in the amino acid substitutions Q43E and G170S (Ambler's positions). The *bla*<sub>GES-16</sub> gene was part of a defective class 1 integron located on a non-conjugative plasmid of about 30-kb. Both the expression of cloned *bla*<sub>GES-16</sub> and the transference of the natural plasmid carrying *bla*<sub>GES-16</sub> to *E. coli* TOP10 resulted in increased MIC values of all  $\beta$ -lactams including carbapenems. Kinetic analysis conducted with purified GES-16 showed hydrolytic activity against penicillins, cephamycins, expanded-spectrum cephalosporins, and carbapenems, but not aztreonam. GES-16 showed a pI of 5.6 and was inhibited by clavulanic acid, tazobactam and, in less extent, by imipenem.

**Conclusions:** This study identified a new GES variant with carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. The increasing diversity of such resistance determinants confirms the ongoing evolution of these  $\beta$ -lactamases towards a broader spectrum of activity.

---

## INTRODUCTION

Carbapenems have been widely regarded as the drugs of choice to treat a variety of severe infections. However, resistance to these drugs has been increasingly observed worldwide over the past decade.<sup>1</sup> In Enterobacteriaceae isolates, resistance to carbapenems might emerge due to modulation and/or combination of different intrinsic and/or acquired mechanisms such as porin alteration; overexpression of efflux pumps; target modification; substantial production of intrinsic cephalosporinases, if present; and production of acquired carbapenemases.<sup>2</sup>

Since the description of the ESBL GES-1, in 2000, fifteen variants differing by one to three amino acid residues have been reported (<http://lahey.org/studies/>).<sup>3, 4</sup> Of notice, substitution of a glycine for either asparagine or serine at Ambler's position 170 is capable of extending the spectrum of activity of the GES-enzymes, leading to carbapenemase activity.<sup>5, 6, 7</sup>

The *bla*<sub>GES</sub> genes are commonly found as cassettes predominantly harbored into the variable region of class I integrons.<sup>2</sup> These genetic structures are notorious due to their ability to accumulate and express determinants of resistance to different classes of antimicrobials. These pools of resistance genes are often mobilized by transposons into broad host range plasmids, which in turn provide great potential to spread.<sup>8, 9, 10</sup> The dissemination of carbapenemase-encoding genes among Enterobacteriaceae often limits the therapeutic options for treatment of such infections restricting them to available antimicrobial agents, like polymyxins and tigecycline.<sup>11</sup> Since some microorganisms such as *S. marcescens* are intrinsically resistant to polymyxins, the dissemination of these resistance genes is particularly worrisome and represents an extra-challenge for clinicians.

---

Here, we describe the emergence of GES-16, a new GES-variant with carbapenemase activity, in two carbapenem-resistant *S. marcescens* clinical isolates that were isolated from Rio de Janeiro, Brazil.

---

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial Strains.** *S. marcescens* clinical isolates SM190 and SM191 were recovered from blood and lower respiratory tract, respectively, of two patients hospitalized at the intensive care unit (ICU) of a tertiary teaching hospital located in Rio de Janeiro, Brazil, in 2005. *Escherichia coli* TOP10, *E. coli* DH5- $\alpha$  and *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, USA) were used as the recipient strains in transformation, cloning, and *bla*<sub>GES-16</sub> expression experiments, respectively.

**Susceptibility testing.** Antimicrobial susceptibility testing was first assessed by disk diffusion, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>12</sup> Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were determined by the broth microdilution method and interpreted according to CLSI guideline.<sup>13, 14</sup> *E. coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality controls.

**Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).** Genetic relatedness between SM190 and SM191 isolates was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *Spe*I restriction enzyme (GE Healthcare, Orsay, France), as previously described.<sup>15</sup> The electrophoresis of digested DNA was conducted on a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad Laboratories, California, EUA). Analysis of PFGE patterns was performed by visual inspection of ethidium bromide-stained gels. The isolates were classified according to the criteria described by Tenover *et al.*<sup>16</sup>

**Screening for carbapenemase activity.** Hydrolysis of imipenem was assessed by UV spectrophotometric assays. Briefly, a full 10  $\mu$ L loop of the test organism was inoculated into 500  $\mu$ L of phosphate buffer 100 mM (pH 7.0) and then disrupted by sonication. Whole-protein extracts were obtained after centrifugation. Hydrolytic

---

activity of 20  $\mu$ l of the crude extract was determined against 100  $\mu$ M imipenem in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), and measurements were carried out at a 297 nm wavelength.

**PCR detection of  $\beta$ -lactamase-encoding genes, analysis of the genetic environment and DNA sequencing.** Total DNA of isolates SM190 and SM191 was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) and used as templates in PCR experiments. Specific primers under standard PCR conditions were used to detect  $\beta$ -lactamase encoding genes, namely *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>.<sup>4, 17-24</sup> For amplicon sequencing, PCR products were purified using PCR purification columns (Quiagen, Courtaboeuf, France). Sequencing reactions were performed using specific primers and an automated ABI 337 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with software available over the internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The genetic environment of *bla*<sub>GES-16</sub> was determined by PCR using the previously published specific primers to anneal at the 5' and 3' conserved sequences (CS) of class 1 integrons, followed by sequencing.<sup>25</sup>

**Transfer of  $\beta$ -lactam resistance, plasmid analysis and southern hybridization.** Natural plasmids were extracted from both SM190 and SM191 isolates by the Kieser method.<sup>26</sup> Plasmids extracted from *E. coli* NCTC 50192 were used as plasmid size markers for electrophoresis assays. Both plasmid and chromosomal DNA preparations were subjected to Southern blott and hybridization experiments using a *bla*<sub>GES</sub> specific probe labeled with the ECL nonradioactive kit (GE Healthcare, Orsay, France).<sup>27</sup> Transformation experiments were performed by electroporation with plasmid

---

extracts from SM190 and SM191, and *E. coli* TOP10 was used as recipient strains. Transformants were selected on agar plates containing 50 mg of ticarcillin per L. Conjugation assays were performed using transformants *E. coli* EC190 and EC191 as donors and azide-resistant *E. coli* J53 (Invitrogen, Carlsbad, USA) as recipient strain. Selection of transconjugants was carried out on Mueller-Hinton supplemented with ticarcillin (200 mg/L) and azide (150 mg/L). Electrophoresis of plasmid DNA extracted from SM190, SM191 and the corresponding transformants *E. coli* EC190 and EC191 was conducted in 0.8% agarose gel (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), as previously described.<sup>27</sup>

**Cloning of *bla*<sub>GES-16</sub>.** To evaluate the relative contribution of GES-16 to  $\beta$ -lactam resistance, the corresponding gene was cloned and expressed in *E. coli* TOP10. Cloning experiments were performed using the pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) following the manufacturer's instructions. External primers (CATB3-FF 5'-ACAATGCCTCTGCTGTGCTC-3'; DFR-R 5'-GGAAGAAGGCGTCACCCTC-3') were used to obtain an amplicon encompassing the entire *bla*<sub>GES-16</sub> gene.

**Isoelectric focusing (IEF) analysis.** Crude extracts of 10 ml cultures of SM190, SM191 and of the corresponding transformants were submitted to IEF analysis, on ampholine polyacrylamide gel (pH 3.5 to 9.5) as previously described.<sup>28</sup> The focused  $\beta$ -lactamases were detected by overlaying the gel with 500 mM nitrocefin (Oxoid, Dardilly, France) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0).

**Purification of GES-16  $\beta$ -lactamase.** To overproduce GES-16  $\beta$ -lactamase in *E. coli*, the *bla*<sub>GES-16</sub> gene was amplified by PCR using primers GES-F (5'-GGA TCC ATG CGC TTC ATT CAC GCA CTA TTA-3') and GES-R (5'-GCG GCC GCT TTG TCC GTG CTC AGG ATG AGT TGT GTA ATA A-3') and a high fidelity DNA

---

polymerase (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The primers were designed to add a BamHI and a NotI linker (underlined), respectively, for in-frame cloning with a poly-His-tag at both the N- and C-termini. The PCR product obtained was cloned into the T/A vector pTZ57-R/T (InsTAclone™ PCR Cloning Kit; Fermentas, Burlington, Canada), and the recombinant colonies were selected by PCR amplification using primers described above. Plasmid DNA from the positive clones was purified and double-digested with BamHI and NotI restriction enzymes, and then subcloned into pET-28 (Novagen, Madison, USA) to construct the version with the poly-histidine tag at the N- and C-termini. The expression vector constructed, named pET-GES16, was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, USA). The correct placing of the DNA insert coding for GES-16 in the reading frame of the expression vector was confirmed by sequencing. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS carrying plasmid pET-GES16 was cultured in 1 liter of fresh LB broth containing kanamycin (50 mg/L) and chloramphenicol (50 mg/L) under agitation at 30°C, until the culture density reached an OD<sub>550</sub> of 0.6. Then isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.5 mM and the culture was incubated at 20°C for 14 – 16 h. The bacterial cells were harvested by centrifugation and were suspended in 20 mL of binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0). Cells were disrupted by sonication, and the lysate was centrifuged at 15,000 rpm for 20 min to remove cell debris. The supernatant was used for subsequent chromatographic purification. Affinity chromatography was performed on a Ni–Sepharose high performance chromatography column (GE Healthcare, Orsay, France) preequilibrated with binding buffer. The recombinant GES-16 was eluted using a segmented step elution with different concentrations of imidazole (50, 100 and 150 mM) in binding

---



buffer. Fractions containing  $\beta$ -lactamase activity (as tested by a nitrocefin assay) were collected and applied to a desalting prep column (GE Healthcare, Orsay, France) with the same buffer for desalinization.  $\beta$ -lactamase activity was recovered in the flow through and the fractions presenting high levels of activity were pooled and collected. Aliquots from these fractions were analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The fractions containing pure recombinant GES-16 were recovered, and the protein was stored in 100 mM phosphate buffer at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Mass spectrometric analysis of GES-16, N-terminal sequencing and Circular dichroism (CD).** The molecular mass of the recombinant GES-16 was determined using the positive ionization mode in MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex LT; Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany), using alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. . The N-terminal sequence was determined by the method of Edman degradation using a protein sequencer PPSQ-23 (Shimadzu, Tokyo, Japan) and an isocratic HPLC system. Far-UV CD spectra were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The spectrometer conditions typically included a sensitivity of 100 mdeg, a resolution of 0.5 nm, a response time of 4 s, a scan rate of 20 nm/min, and 4 accumulations at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Kinetic measurements.** Purified  $\beta$ -lactamase was used for kinetic measurements performed at  $30^{\circ}\text{C}$  in 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) with U 2000 UV spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). The molar extinction coefficients ( $\Delta\epsilon$  values) were used as follows: for benzylpenicillin (232 nm),  $-1,100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for oxacillin (260 nm),  $+470\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for cephalothin (262 nm),  $-7,960\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for cefoxitin (265 nm),  $-7,380\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for cefotaxime (265 nm),  $-6,260\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for ceftazidime (260 nm),  $-8,660\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for cefepime (264 nm),  $-8,240\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; for

---

aztreonam (318 nm),  $-640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; for imipenem (297 nm),  $-9,210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; for meropenem (297 nm),  $-6,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; and for ertapenem (298 nm),  $-7,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>4, 29, 30</sup> Kinetic parameters were determined by recording the initial rates at different substrate concentrations and by analyzing the results with the regression analysis program Grit, version 5.0 (Erithacus Software, Steines, UK). The  $k_{cat}$  and  $K_m$  values were estimated by using a nonlinear least-squares regression. The kinetic parameters were calculated according Wilkinson,<sup>31</sup> as well as by using Eadie-Hofstee plots.

Inhibition constants ( $K_i$  and/or  $k_{inact}$ ) were determined for clavulanic acid, tazobactam, and imipenem. Various concentrations of these inhibitors were pre-incubated with the purified enzyme and the hydrolysis rate of  $300 \mu\text{M}$  benzylpenicillin was measured. Determination of inhibition parameters: for imipenem that behaved as competitive inhibitor, the equation used to calculate the  $K_i$  values was  $K_i = K_{i app}/(1+[S]/K_m)$ , where  $[S]$  = molar concentration of the substrate,  $K_m$  = Michaelis constant and  $K_{i app}$  = apparent inhibition constant ( $K_{i app} = \text{IC}_{50}$ ).  $K_{i app}$  was calculated using the equation  $V_0/V_i = 1 + [I]/K_{i app}$ , where  $V_0$  = velocity of hydrolysis without the inhibitor,  $V_i$  = velocity of hydrolysis in the presence of the inhibitor and  $[I]$  = molar concentration of the inhibitor. A plot of  $(V_0/V_i) - 1$  versus  $[I]$  yields a slope of  $1/K_{i app}$ . However, the clavulanic acid and tazobactam presented an irreversible time dependent inhibition and then the  $k_{inact}$  was determined using the  $k_{obs}/[I]$  values, where  $k_{obs}$  is the observed pseudo-first order rate of inactivation (obtained by plotting the log of % activity vs. time) and  $[I]$  is the concentration of inhibitor. The  $k_{obs}/[I]$  parameter is valid as long as the inhibitor does not saturate binding with the enzyme (in which case  $k_{obs} = k_{inact}$ ) (more details can be found elsewhere<sup>32</sup>).

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence data reported in this paper have been deposited in GenBank under the accession number HM173356.

---

## RESULTS

SM190 and SM191 were isolated from blood and lower respiratory tract, respectively, of two patients hospitalized at an ICU of a tertiary teaching hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. SM190 and SM191 were initially detected as resistant to carbapenems by disk diffusion performed at the clinical microbiology laboratory and referred to Laboratory ALERTA for further characterization. CLSI microdilution confirmed resistance to carbapenems (MICs  $\geq 32$  mg/L). These isolates also showed full resistance to ticarcillin, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin and nalidixic acid, but were susceptible to cefepime and aztreonam (Table 1). Imipenemase activity not inhibited by EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) in crude extracts of both isolates SM190 and SM191 was detected by spectrophotometric assays. Preliminary PCR detection of ESBL-, MBL-, KPC- and OXA-encoding genes yielded positive results only for *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>OXA-10</sub> for both *S. marcescens* isolates. PFGE analysis showed identical band patterns for SM190 and SM191, indicating their clonal origin.

Sequencing of *bla*<sub>GES</sub> amplicons revealed the presence of a new GES-type  $\beta$ -lactamase encoding gene, *bla*<sub>GES-16</sub>, in both SM190 and SM191. GES-16-encoding gene differed by a C to G mutation at position 112, G to A mutation at position 493, T to C mutation at position 591 and an A to G mutation at position 645 compared to *bla*<sub>GES-1</sub>. The deduced amino acid sequence of GES-16 had only 2 amino acid substitutions, compared to that of GES-1: glutamine to glutamic acid at Ambler's position 43 (Q43E) and glycine to serine at Ambler's position 170 (G170S), within the  $\Omega$ -loop region of the Ambler class A  $\beta$ -lactamases.<sup>4</sup> The *bla*<sub>GES-16</sub> gene was part of a class 1 integron composed of a fragmented integrase gene *IntI1* that lacked eight amino acids in its N-terminal portion, including its *attI1* recombination site (Figure 1). A weak putative promoter sequence named P<sub>c</sub> was found in the structural integrase gene.<sup>33-35</sup> The *bla*<sub>GES-</sub>

---

*bla*<sub>GES-16</sub> gene was located on the second position of the integron, immediately downstream of a *catB3* fragment that lacked 134 amino acids of its N-terminal portion. The *bla*<sub>GES-16</sub> gene cassette contained a core site (GTTAGCC), an inverse core site (GTCTAAC) and an *attC* comprising 110 bp, which showed a putative Shine-Dalgarno (SD) sequence (AGGCG) located 48 bp upstream *bla*<sub>GES-16</sub> start codon. *Bla*<sub>GES-16</sub> was followed by the cassettes *dfr22*, *aac(6')-IIc* and *aadA1*, encoding a dihydrofolate reductase, an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase and an aminoglycoside adenylyltransferase, respectively. Amplicon sequencing also revealed the presence of the *bla*<sub>OXA-10</sub> gene, encoding a narrow spectrum  $\beta$ -lactamase, in both *S. marcescens* isolates.

Extracted plasmid DNAs from isolates SM190 and SM191 were transferred by electroporation into *E. coli* TOP10 and transformants were selected onto ticarcillin-containing agar plates. However, repeated attempts to transfer resistance by conjugation were unsuccessful. The obtained transformants EC190 and EC191 harbored a single visible plasmid of about ca. 30-kb, named pSM190 and pSM191, respectively. Hybridization using an internal probe for *bla*<sub>GES-16</sub> confirmed its presence on plasmids pSM190 and pSM191.

The MICs of antimicrobials tested against *S. marcescens* isolates SM190 and SM191, transformants *E. coli* EC190 and EC191, *E. coli* TOP10 harboring cloned *bla*<sub>GES-16</sub> (EC-REC) and the recipient strain *E. coli* TOP10 were listed in Table 1. Imipenem MICs were two-fold higher for EC190, EC191 and EC-REC than for *E. coli* TOP10, while meropenem and ertapenem MICs were four-fold and five-fold higher, respectively. Increased penicillin and cephaloporins MICs were also noticed for EC190 and EC191 transformants and for EC-REC when compared to *E. coli* TOP10. However, no modifications on the aztreonam MICs were observed. Against *S. marcescens* donor isolates, the addition of clavulanic acid did not reduce the MICs of carbapenems or

---

ticarcillin. In contrast, reduction of all carbapenems MICs was observed for the EC-REC, while against the transformants, only meropenem and ertapenem activities were inhibited by clavulanic acid.

The recombinant GES-16 was obtained using cloning, expression and purification protocols as described. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed a single band of approximately 31 kDa, and the purity of the enzyme was estimated to be >90%. To confirm the molecular mass of the obtained recombinant GES-16, the molecular weight was determined using MALDI-TOF mass spectrometry. The mass spectrometry indicated a main peak of 31,083 Da, in agreement with the molecular weight observed in SDS-PAGE. N-terminal sequencing of the ten first amino acids of the purified protein were Ala-Gly-Ile-Ala- His-Ser-Ala-Tyr-Ala-Ser, confirming GES-16 purification. The structural analysis of the recombinant GES-16 was assessed using far-UV CD. Results of circular dichroism are consistent with those expected from correctly folded proteins.<sup>36</sup>

Kinetic parameters of GES-16 showed its broad-spectrum hydrolysis profile (Table 2). The enzyme was able to hydrolyze penicillins, cephamycin, cephalosporins and carbapenems, but not aztreonam. GES-16 showed similar affinity ( $K_m$ ) for benzylpenicillin, oxacillin, cephalothin, cefoxitin and cefepime. However, benzylpenicillin and cephalothin were more efficiently hydrolyzed due to higher  $k_{cat}$  values. Among cephalosporins, cephalothin and cefotaxime were more efficiently hydrolyzed, whereas ceftazidime was not hydrolyzed as efficiently as cefotaxime due to its low  $k_{cat}$  value. Cefepime was not a good substrate for GES-16 since it showed low  $k_{cat}$  and high  $K_m$  values. Imipenem was the carbapenem more efficiently hydrolyzed by GES-16. Although the affinities of imipenem and meropenem for GES-16 were very similar, meropenem seemed to be less hydrolyzed than imipenem due to lower  $k_{cat}$

---

values. Ertapenem was poorly hydrolyzed, especially due to very low  $k_{\text{cat}}$  value. Activity inhibition measurements using benzylpenicillin as a reporter substrate showed that GES-16 was inhibited by clavulanic acid and tazobactam, and less efficiently by imipenem (Table 3). IEF analysis showed that GES-16 focused at pI value of 5.6.

---

## DISCUSSION

In this study, we report the identification of a novel GES-type class A enzyme with carbapenemase activity, GES-16, in two *S. marcescens* clinical isolates, SM190 and SM191, recovered from two patients hospitalized at ICU. Clonal relatedness was observed by PFGE between isolates SM190 and SM191 indicating a common source of acquisition or patient-to-patient cross transmission.

Carbapenem resistance in both *S. marcescens* isolates was first detected by disk diffusion, and later confirmed by CLSI broth microdilution. High level of resistance to other antimicrobials, including  $\beta$ -lactams, aminoglycosides and quinolones were also shown by both isolates. Although *bla*<sub>OXA-10</sub> was detected in both SM190 and SM191 isolates, this narrow-spectrum  $\beta$ -lactamase did not contribute directly for carbapenem resistance.

Despite of the fact that the plasmid was not conjugative by mating assays carried out, successful transference of *bla*<sub>GES-16</sub> to an *E. coli* strain by transformation suggested its plasmid location and its ability to be mobilized. Transference of the *bla*<sub>GES-16</sub> to *E. coli* TOP10 recipient strain either by cloning or plasmid transformation led to increased MICs for all  $\beta$ -lactams, including carbapenems, but not for aztreonam since this antimicrobial is not hydrolyzed by GES-16.

The *bla*<sub>GES-16</sub> was found as a gene cassette inserted at the second position of the variable region of a class 1 integron, after a fragmented *catB3* cassette. *catB3* was fused to an integrase-encoding gene, and both genes lost part of their encoding regions. This fusion probably resulted from a homologous recombination event between *IntI* and *catB3*, where the *attI* recombination site, P<sub>2</sub> and P<sub>i</sub> promoters were lost. As a consequence of this recombination event, site specific recombination between *attI* and cassettes *attC* will probably not take place in this integron.<sup>37</sup> In addition, since the

---

integrase lost part of its encoding sequence as well as the promoter P<sub>i</sub> that would drive its expression, further recombination events within this integron will not take place unless another integrase is present to act *in trans* in *bla*<sub>GES-16</sub>-harboring integron.

Efficient gene translation normally requires the presence of a translation initiation region (TIR) consisting of the initiation codon, a SD sequence and an adequate spacer between them. However, some gene cassettes lack such sequence. In class 1 integrons the translation of cassettes lacking TIR has been associated with coupled-translation with ORF-11 or ORF-18, depending on the formation or not of a stop codon in the GTTRRRY core site after recombination between *attI1* and *att*.<sup>38</sup> Since the integron identified in this study lacked part of its integrase gene, the region coding for ORF-11 or -18 was not present, and expression of the cassettes could be impaired. However, we have identified a putative 48 bp SD sequence upstream of *bla*<sub>GES-16</sub> initiation codon, which might have provided conditions for its proper expression.

A critical active site serine in enzymes belonging to classes A, C, and D experiences acylation followed by deacylation by the antimicrobial during its hydrolysis,<sup>39</sup> and acylation and deacylation rates are essential for carbapenemase activity. GES-16 had two amino acid substitutions, G170S and Q43E, compared to the sequence of GES-1. The mutation at Ambler's position 170 is well characterized to be responsible for extending the hydrolytic spectrum towards carbapenems since it is located within the  $\Omega$ -loop region of class A  $\beta$ -lactamases. This substitution has already been reported in the GES -4,-5,-6, -14 and -15 variants, all of them showing activity towards carbapenems.<sup>3, 7</sup> Frase *et al.* demonstrated that the Gly-170 substitution in GES enzymes had a remarkable impact on the turnover of imipenem during the catalytic cycle. G170S substitution in GES enzymes led to a 5000-fold enhancement in the rate

---



of acylation over that of GES-1, although a minor improvement of deacylation rate was also observed.<sup>39</sup> The G170S substitution also resulted in increased cefoxitin hydrolysis in GES-5, GES-6 and GES-14, while it diminished the hydrolytic efficiency against ceftazidime as observed for GES-16.<sup>5, 40-42</sup>

The other substitution identified in GES-16, Q43E, is not located in any conserved position of class A  $\beta$ -lactamases, and has not been identified in any other GES-variant so far. Although its function remains to be further characterized, by comparing results obtained with GES-16 (Table 2) with those previously published for GES-5,<sup>5</sup> we observed that the Q43E mutation significantly modified the  $\beta$ -lactamase kinetic parameters, especially  $K_m$  values for all tested substrates.

In Brazil, GES-1, GES-5 and GES-7 enzymes have been previously identified.<sup>43-45</sup> Thus, GES-16 might have evolved from GES-5 after a point mutation that led to a single amino acid substitution. Kinetic parameters suggest that the Q43E substitution confers advantage in affinity, and consequently in hydrolytic profile of the enzyme.

The findings presented in this study demonstrated that GES-16 confer low-level resistance to carbapenems. Since *S. marcescens* SM190 and SM191 were fully resistant to carbapenems, it is likely that this phenotype is due to simultaneous presence of additional mechanisms of resistance e.g. decreased outer membrane permeability and/or hyperproduction of AmpC beta-lactamase.

*Bla*<sub>GES-16</sub> was found in a class 1 integron inserted in a plasmid that kept viable upon transference to an *E. coli* strain. Despite of being not conjugative, the plasmid can be mobilized indicating a high potential for dissemination to other Enterobacteriaceae species, and even to other unrelated bacteria. The recent increase in reports of new  $\beta$ -lactamases, especially those with carbapenemase activity, indicates the ongoing

---

evolution of these resistance determinants towards a broader spectrum of activity. Currently, this is one of the most worrisome issues in clinical practice especially when involving species that are intrinsically resistant to polymyxins like *S. marcescens*. Thus, the comprehension of mechanisms involved in genetic evolution of bacteria leading to multidrug resistance phenotype is critical for development of strategies that would prevent the occurrence or emergence of these events in the future.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the National Council for Science and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (Process number: 307816/2009-5). We thank Dr. Marisa Fabiana Nicolás for her assistance in analyzing the putative TIR sequences of *bla*<sub>GES-16</sub> and Dr. Laurent Poirel for critically reviewing this manuscript.

## FUNDING

This work was partially funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Process No. 2010 / 06038-1).

## TRANSPARENCY DECLARATIONS

None to declare.

---

## REFERENCES

1. **Hawkey PM, Jones AM.** The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64** Suppl 1:3-10.
  2. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**:470-82.
  3. **Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** Suppl 1:42-52.
  4. **Poirel L, Le Thomas I, Naas T *et al.*** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:622-32.
  5. **Bae IK, Lee YN, Jeong SH *et al.*** Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **58**:465-8.
  6. **Poirel L, Weldhagen GF, Naas T *et al.*** GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**:2598-603.
  7. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol* 2007; **20**:440-58.
  8. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; **153** Suppl 1:S347-57.
  9. **Hall RM, Collis CM.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995; **15**:593-600.
-

10. **Hall RM, Collis CM, Kim MJ *et al.*** Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **870**:68-80.
  11. **Livermore DM.** The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; **3**:218-24.
  12. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Tenth Edition: Approved Standard M2-A10.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
  13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically - Eighth Edition: Approved Standard M7-A8.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
  14. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
  15. **Poirel L, Magalhaes M, Lopes M *et al.*** Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>SPM-1</sub>-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:1406–9.
  16. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.*** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:2233–9.
  17. **Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J *et al.*** Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:544-7.
-

18. **Moland ES, Hanson ND, Herrera VL *et al.*** Plasmid mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2003; **51**:711–4.
  19. **Nagano N, Nagano Y, Cordevant C *et al.*** Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing in *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol 2004; **42**:3978-84.
  20. **Poirel L, Heritier C, Tolun V *et al.*** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:15-22.
  21. **Poirel L, Gerome P, De Champs C *et al.*** Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2002; **46**:566-9.
  22. **Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS *et al.*** SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; **44**:3035-9.
  23. **Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H *et al.*** Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol 1998; **36**:827-9.
  24. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.*** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Inter J Antimicrob Agents 2006; **27**: 351-3.
  25. **Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H *et al.*** Genetic environment and expression of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>PER-1</sub> gene in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**:1708– 13.
-

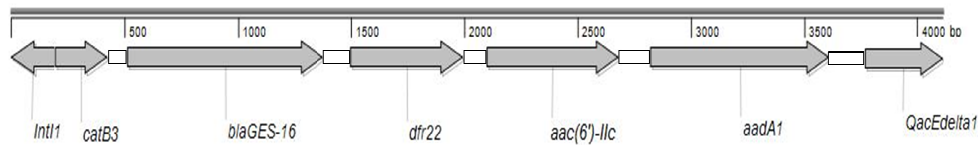
26. **Kieser T.** Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid 1984; **12**:19–36.
  27. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
  28. **Philippon LN, Naas T, Bouthors AT et al.** OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1997; **41**:2188-95.
  29. **Celenza G, Luzzi C, Aschi M et al.** Natural D240G Toho-1 mutant conferring resistance to ceftazidime: biochemical characterization of CTX-M-43. J Antimicrob Chemother 2008; **62**:991-7.
  30. **Giuliani F, Docquier JD, Riccio ML et al.** OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a *bla*<sub>VIM-1</sub>-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**:1973-80.
  31. **Wilkinson GN.** Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochem J 1961; **80**:324–32.
  32. **Cunha RL, Gouvêa IE, Feitosa GP et al.** Irreversible inhibition of human cathepsins B, L, S and K by hypervalent tellurium compounds. Biol Chem 2009; **390**:1205-12.
  33. **Collis CM, Hall RM.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother 1995; **39**:155–62.
-

34. **Le´vesque C, Brassard S, Lapointe J *et al.*** Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* 1994; **142**:49–54.
  35. **Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Miriagou V.** Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:277-80.
  36. **Bohm G, Muhr R, Jaenicke R.** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 1992; **5**:191–5.
  37. **Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C *et al.*** Definition of the *attII* site of class 1 integrons. *Microbiology* 2000; **146**:2855-64.
  38. **Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R *et al.*** Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol* 2007; **20**:79-114.
  39. **Frase H, Shi Q, Testero SA *et al.*** Mechanistic basis for the emergence of catalytic competence against carbapenem antibiotics by the GES family of beta-lactamases. *J Biol Chem* 2009; **284**:29509-13.
  40. **Bogaerts P, Naas T, El Garch F *et al.*** GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:4872-8.
  41. **Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E *et al.*** Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at Ambler positions 104 and 170 in GES  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:4864-71.
-

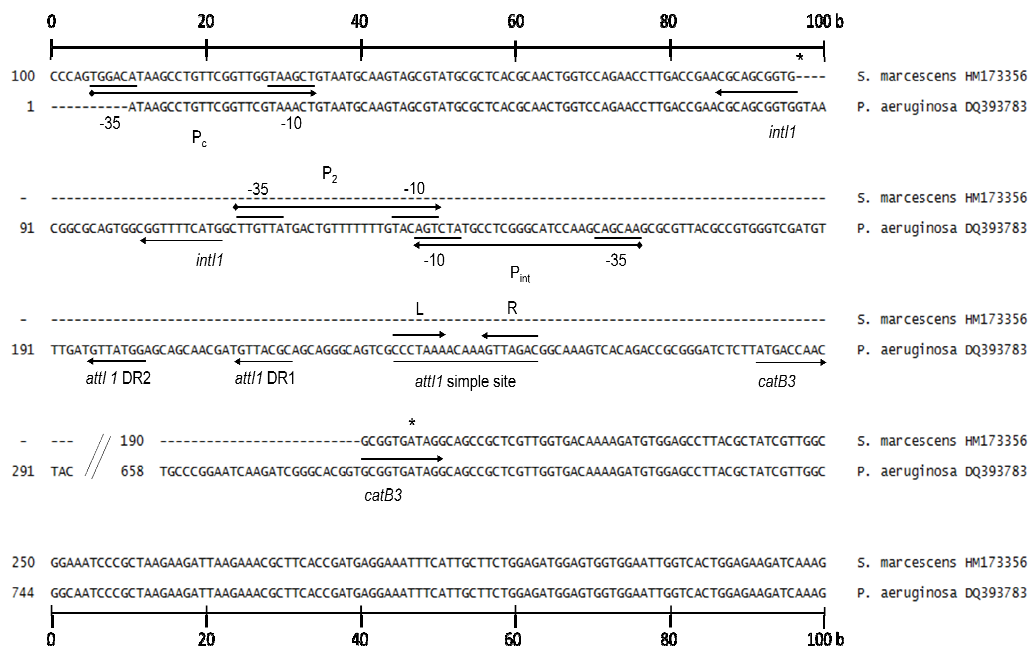
- 
42. **Bonnin RA, Nordmann P, Potron A *et al.*** Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011; **55**:349-54.
43. **Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR *et al.*** Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:2344-5.
44. **Da Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R *et al.*** Emergence of *bla*<sub>GES-5</sub> in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. J Antimicrob Chemother 2007; **59**:576-7.
45. **Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N *et al.*** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. Clin Microbiol Infect 2010; **16**:630-2.
-



A.



B.



**Figure 1.** (A) Schematic representation of the integron containing the *bla*<sub>GES-16</sub> gene. Arrows represent coding sequences and indicate transcription orientation. The *attC*s are indicated by white rectangles. (B) Comparison between the nucleotide sequence of the integron identified in this study (GenBank accession no. HM173356) and a similar one previously identified in *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank accession no. DQ393783), exhibiting the structures lost in the *bla*<sub>GES-16</sub>-containing integron. The -35 and -10 sequences of promoters P<sub>c</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>int</sub> are indicated. The start codons of the *intI1* and *catB3* genes are indicated by horizontal arrows in both integron sequences, as well as the *attI1* site (DR1, DR2, L and R domains) that are missing in the *bla*<sub>GES-16</sub>-containing integron are indicated in the integron sequence from *P. aeruginosa*. The probable site for homologous recombination is boxed and indicated by asterisks in the *bla*<sub>GES-16</sub>-containing integron sequence from *S. marcescens*.

**Table 1.** MICs of  $\beta$ -lactams for parental strains, transformants and reference strain *E. coli* TOP10.

$\beta$ -Lactam(s)	MIC (mg/ml) for:				
	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	SM 190	SM 191	EC190	EC191	TOP10
Ticarcillin	>512	>512	>512	>512	2
Ticarcillin + clavulanate 2 $\mu$ g/ml	>512	>512	>512	>512	2
Ceftazidime	16	16	8	8	0.25
Cefepima	2	4	0.25	0.25	$\leq 0,06$
Imipenem	32	32	0.5	0.5	0.12
Imipenem + clavulanate 4 $\mu$ g/ml	32	32	0.25	0.25	0.06
Meropenem	64	64	0.25	0.25	0.015
Meropenem + clavulanate 4 $\mu$ g/ml	64	64	0.06	0.06	0.015
Ertapenem	64	64	0.25	0.25	0.006
Ertapenem + clavulanate 4 $\mu$ g/ml	64	64	0.006	0.006	0.003
Aztreonam	4	2	0.25	0.25	0.12
Gentamicin	>64	64	2	1	1
Amikacin	32	16	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$
Ciprofloxacin	4	4	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$
Nalidixic Acid	>128	>128	2	2	1

**Table 2.** Steady-state kinetic parameters of the purified GES-16  $\beta$ -lactamase

Substrate	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ )
Benzylpenicillin	35.48	88.43	401.24
Oxacillin	3.24	72.92	44.37
Cephalothin	30.51	75.11	406.14
Cefoxitin	4.93	89.80	54.93
Cefotaxime	5.21	18.96	274.62
Ceftazidime	0.42	44.81	9.34
Cefepime	0.17	85.97	1.95
Aztreonam	— <sup>b</sup>	—	—
Imipenem	0.49	1.78	275.28
Meropenem	0.052	1.23	42.28
Ertapenem	0.013	0.6	21.67

<sup>a</sup> Values are means of three independent measures (standard deviations of the values were within 20%).

<sup>b</sup> No measurable hydrolysis was detected after 2 h of incubation.

**Table 3.** Inhibition profile of GES-16  $\beta$ -lactamase.

Inhibitor	$K_i$ ( $\mu M^{-1}$ )	$K_{inact}$ ( $s^{-1}$ )
Clavulanic Acid	1.38	0.00262
Tazobactam	2.92	0.00318
Imipenem	3.69	—